



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Fisica e Astronomia "Galileo Galilei"

Corso di Laurea Magistrale in Fisica

Tesi di Laurea

## Optical mini-Tweezers: un esperimento di singola molecola

Relatrice

Dr.ssa Annamaria Zaltron

Correlatore

Prof. Giampaolo Mistura

Laureando

Clara Zaccaria

Anno Accademico 2017/2018

# Indice

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Indice</b>   | <b>1</b>  |
| <b>Introduzione</b>   | <b>3</b>  |
| <b>1 Intrappolamento ottico</b>                                       | <b>7</b>  |
| 1.1 Principio fisico dell'intrappolamento ottico . . . . .            | 7         |
| 1.2 Misura di forze basata sulla conservazione della quantità di moto | 12        |
| 1.3 Optical Tweezers . . . . .  | 14        |
| <b>2 Set-up sperimentale</b>  | <b>19</b> |
| 2.1 Descrizione dell'apparato di misura . . . . .                     | 19        |
| 2.1.1 Laser e trappola ottica . . . . .                               | 20        |
| 2.1.2 Percorso del fascio . . . . .                                   | 22        |
| 2.1.3 Sensori di posizione e forza . . . . .                          | 23        |
| 2.1.4 Sistema di imaging . . . . .                                    | 26        |
| 2.1.5 Camera microfluidica . . . . .                                  | 27        |
| 2.2 Calibrazione dell'apparato . . . . .                              | 35        |
| 2.2.1 Calibrazione in tempo . . . . .                                 | 35        |
| 2.2.2 Calibrazione della posizione della trappola . . . . .           | 35        |
| 2.2.3 Calibrazione in forza . . . . .                                 | 36        |
| 2.2.4 Calibrazione per la posizione della biglia . . . . .            | 39        |
| <b>3 Esperimenti di singola molecola</b>                              | <b>43</b> |
| 3.1 Biomolecole . . . . .   | 43        |
| 3.1.1 Acidi nucleici . . . . .  | 44        |

---

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| 3.1.2    | Proteine . . . . .   | 46         |
| 3.1.3    | Il sistema biologico CD4L20 . . . . .  | 48         |
| 3.2      | Manipolazione di singole molecole . . . . .  | 49         |
| 3.2.1    | Funzionalizzazione delle biglie . . . . .  | 49         |
| 3.2.2    | Procedura sperimentale . . . . .   | 51         |
| 3.3      | Modellizzazione delle catene polimeriche . . . . .                                 | 54         |
| 3.3.1    | Catene ideali . . . . .  | 54         |
| 3.3.2    | Elasticità di un polimero . . . . .  | 57         |
| 3.4      | Esperimenti di pulling . . . . .   | 60         |
| 3.4.1    | Modello del sistema molecolare . . . . .   | 61         |
| 3.4.2    | Proprietà elastiche derivanti dall'analisi del salto della<br>forza . . . . .      | 63         |
| 3.5      | Energia libera del sistema . . . . .   | 70         |
| 3.5.1    | Energia libera di un acido nucleico sotto azione di una<br>forza esterna . . . . . | 71         |
| <b>4</b> | <b>Misura sperimentale dell'energia libera del sistema</b>                         | <b>77</b>  |
| 4.1      | Dynamic force spectroscopy . . . . .   | 77         |
| 4.2      | Teoria degli stati transizionali . . . . .   | 82         |
| 4.2.1    | Stima delle costanti cinetiche sperimentali . . . . .                              | 84         |
| 4.3      | Modello di Bell-Evans . . . . .  | 88         |
| 4.4      | Stima della forza di coesistenza . . . . .   | 94         |
| 4.5      | Metodo di Kramers . . . . .  | 95         |
|          | <b>Conclusioni</b>   | <b>105</b> |
|          | <b>Bibliografia</b>  | <b>111</b> |

# Introduzione

La biofisica è una disciplina scientifica nata dall'incontro tra le conoscenze biochimiche della biologia e le tecniche di studio e di indagine proprie della fisica. In particolare, la biofisica molecolare si occupa dello studio di biopolimeri come gli acidi nucleici e proteine, indagandone la struttura, la funzione biologica e la cinetica, aspetti cruciali per il loro ruolo all'interno dei vari processi biologici negli organismi viventi. Infatti, affinché un biopolimero possa svolgere la sua funzione biologica, è necessario che esso si trovi in una data configurazione energetica e tridimensionale. Pertanto capire come una catena polimerica si apre o richiude in determinati stati energetici è uno dei principali obiettivi di questa area scientifica.

Le tecniche sviluppate per lo studio dei sistemi biologici sono moltissime ed ognuna di esse ha permesso di comprendere la struttura e la funzione delle biomolecole e di formulare modelli per caratterizzarle e prevederne il comportamento. La maggior parte delle tecniche più usate prevedono però lo studio simultaneo di una grande quantità di molecole, ottenendo solamente informazioni mediate su un grande numero di molecole, dell'ordine del numero di Avogadro. Tuttavia le biomolecole presentano specifiche strutture interne e dinamiche complesse che non è possibile indagare in dettaglio con tali tecniche. Recenti sviluppi nell'ambito delle nano- e bio-tecnologie hanno aperto le porte alla progettazione e costruzione di strumenti scientifici in grado di realizzare esperimenti di singola molecola (SME), in cui le molecole vengono studiate e manipolate individualmente. Ciò ha permesso di consolidare la sinergia tra la fisica e le scienze biochimiche, ottenendo informazioni sulle caratteristiche conformazionali e cinetiche dei sistemi studiati che fino a pochi decenni fa erano impensabili.



Le principali tecniche SME sono i microscopi a forza atomica (AFM), le pinzette magnetiche (MT) e le pinzette ottiche (OT). In tutte queste tecniche le estremità del sistema in studio vengono fissate a due superfici opportunamente funzionalizzate, muovendo le quali si applicano delle forze e spostamenti sul sistema. In genere una delle due superfici è costituita da una biglia che viene intrappolata un campo magnetico (MT) o tramite intrappolamento ottico (OT). Nel caso invece della tecnica AFM la seconda superficie è la punta di un'asta, dalla cui deflessione si evincono le forze in gioco nel sistema. Tra queste tecniche le pinzette ottiche emergono per le potenzialità intrinseche dello strumento, che consentono di effettuare misure di forza ed estensione della molecola in maniera precisa e controllata, con precisione del decimo di pN e del decimo di nm, rispettivamente. [1, 2]

Nel presente lavoro di tesi si è effettuato lo studio di un hairpin CD4L20 mRNA, utilizzando il sistema sperimentale mini-Optical Tweezers acquistato nel 2017 per mezzo di una collaborazione interdipartimentale dell'Università di Padova, in cui il Dipartimento di Fisica e Astronomia *Galileo Galilei* ha giocato un ruolo chiave.

L'hairpin CD4L20 studiato è una modificazione del più noto hairpin CD4 mRNA. Quest'ultimo è particolarmente interessante in ambito biomedico, poichè viene coinvolto nel processo biochimico in cui il virus dell'immunodeficienza umana (HIV) attacca il sistema immunitario umano.

Nello specifico, l'hairpin CD4L20 presenta un loop molto più lungo di quello della molecola CD4, costituito da ben 20 nucleotidi che rappresentano un terzo di tutta la catena nucleotidica del sistema. Tale variazione è stata progettata e realizzata per poter studiare come modifiche nella struttura primaria e secondaria del sistema alterino il suo profilo energetico (*Free Energy Landscape*) e, in ultima analisi, la funzione biologica svolta, provocando un rallentamento o inibizione della modalità con cui l'HIV infetta le cellule. Da questo punto di vista le pinzette ottiche offrono quindi un'occasione unica per ottenere maggiori informazioni sulle configurazioni energetiche della molecola CD4L20 e sulla loro relazione con le proprietà composizionali e strutturali dell'hairpin [21].

La configurazione sperimentale utilizzata prevede il fissaggio della catena

nucleotidica, tramite opportune reazioni biochimiche, a due biglie di polistirene, di cui una è mantenuta in posizione fissa sulla punta della micropipetta e l'altra è intrappolata otticamente per mezzo di due fasci laser ( $\lambda = 805 \text{ nm}$ ) contropropaganti. L'esperimento avviene all'interno di una camera microfluidica ed è monitorato tramite un opportuno sistema di imaging [5, 6, 11, 12]. Durante il lavoro di tesi sono state effettuate misure di allungamento/ripiegamento (pulling) sulla catena nucleotidica: le due biglie vengono allontanate e avvicinate tra loro movimentando la trappola ottica, così da applicare sul sistema in esame una forza tale da indurne una chiusura o apertura. Dalle misure di forza è possibile ottenere importanti parametri elastici del sistema e, tramite il modello teorico Worm Like Chain (WLC), tracciare un primo profilo energetico della molecola [25, 26, 27]. A partire dalle distribuzioni delle forze di apertura/chiusura si sono ottenute le costanti cinetiche che caratterizzano i processi di transizione tra lo stato aperto e chiuso dell'hairpin, dalle quali si è risaliti alle energie in gioco nei diversi processi tramite il modello teorico di Bell-Evans e il metodo di Kramers [36, 37, 23]. Tali analisi permettono in primo luogo di definire il free energy landscape della molecola e come esso varia sotto l'azione di una forza esterna, aiutando anche a caratterizzare gli stati transizionali della molecola e l'eventuale presenza di stati intermedi stabili o metastabili.

La Tesi si articola nelle seguenti parti:

- nel primo capitolo viene trattato il principio fisico dell'intrappolamento ottico su cui si basano i sistemi di Optical Tweezers;
- nel secondo capitolo vi è la descrizione dell'apparato strumentale utilizzato, soffermandosi sulle componenti più rilevanti per il suo buon funzionamento e sulle procedure di calibrazione in posizione e forza;
- nel terzo capitolo viene presentato il sistema biologico in studio, l'hairpin CD4L20 mRNA e le procedure sperimentali utilizzate per il suo studio. Sono descritti gli esperimenti di pulling e la modellizzazione teorica Worm Like Chain (WLC), fino alla determinazione dei principali parametri elastici del sistema. A partire da questi parametri è stato

quindi calcolato il Free Energy Landscape (FEL) del sistema usando il numero di paia di basi dello stem come parametro di reazione;

- nel quarto capitolo viene affrontata la teoria degli stati transizionali e, a partire dalle costanti cinetiche derivate dai dati sperimentali, vengono ricercati i parametri energetici del sistema (forza di coesistenza, energia e posizione degli stati transizionali) al variare della forza tramite il modello di Bell-Evans e il metodo di Kramers.

# Capitolo 1

## Intrappolamento ottico

### 1.1 Principio fisico dell'intrappolamento ottico

Per *pressione di radiazione* si intende la pressione che è esercitata su un oggetto quando viene esposto a radiazione elettromagnetica. Questo risultato include diversi fenomeni, come l'assorbimento e la rifrazione della luce, controllando i quali è possibile applicare forze su piccoli oggetti.

Nel 1970 Arthur Ashkin dimostrò sperimentalmente che la pressione di radiazione può essere utilizzata per accelerare biglie sferiche di materiale dielettrico di dimensione micrometrica, sospese in un liquido o in un gas [3].

La forza esercitata dalla radiazione luminosa sulla biglia può essere scomposta in due contributi principali: la forza di scattering (*scattering force*) che causa il moto del corpo lungo la direzione di propagazione del fascio e la forza di gradiente (*gradient force*) che lo spinge verso la zona centrale del fascio, dove l'intensità luminosa è massima (Fig. 1.3). La direzione di tale moto dipende dai valori relativi degli indici di rifrazione del corpo intrappolato ( $n_b$ ) e del liquido ( $n_m$ ): in particolare, se  $n_b$  è maggiore di  $n_m$  la biglia verrà attratta verso la posizione dove l'intensità luminosa è massima, nel caso contrario verrà invece respinta. Al fine di realizzare un intrappolamento ottico è necessario quindi che  $n_b$  sia maggiore di  $n_m$ .

In un secondo esperimento Ashkin realizzò l'intrappolamento ottico di una biglia utilizzando due fasci laser identici e contropropaganti [3]: in questa

maniera le forze di scattering si annullano e la biglia rimane intrappolata in un punto fisso. Nel 1986 dimostrò inoltre che focalizzando il fascio luminoso con una lente ad alta apertura numerica la forza di gradiente è talmente elevata da intrappolare la particella vicino al punto di fuoco [4]: l'intrappolamento ottico può essere quindi realizzato solamente nel momento in cui la forza di gradiente prevale su quella di scattering (Fig. 1.1).

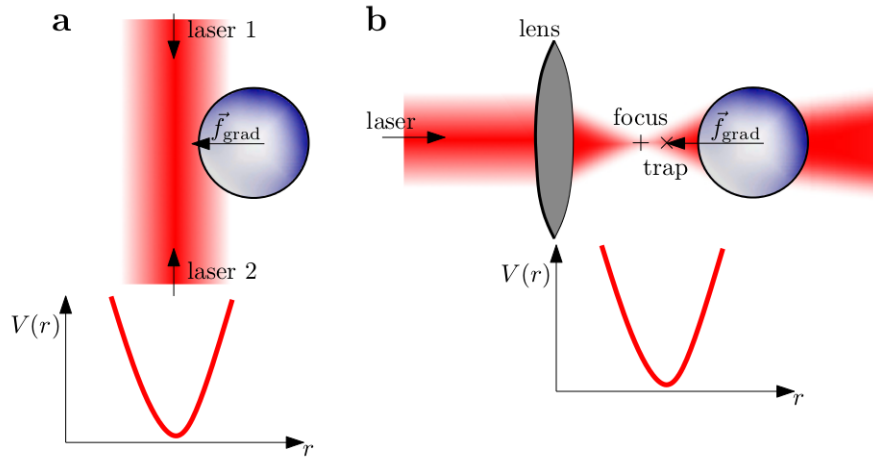


Figura 1.1: **Intrappolamento ottico realizzato mediante l'utilizzo di due fasci laser identici contropaganti (a) e tramite focalizzazione con lente ad alta apertura numerica (b) [5].** In (a) le due forze di scattering si annullano a vicenda, mentre le forze di gradiente si sommano, portando la biglia verso la zona centrale dei due fasci. In (b) La biglia viene portata dalla forza di gradiente verso un punto (x) vicino al fuoco della lente (+). Per entrambi i casi viene riportata la buca di potenziale ottico  $V(r)$ , con  $r$  la coordinata che indica la posizione della biglia rispetto alla trappola ottica.

Per la descrizione dei principi fisici dell'intrappolamento ottico vi sono tre differenti approcci teorici, che variano a seconda del rapporto tra la lunghezza d'onda ( $\lambda$ ) della radiazione utilizzata e il diametro della biglia ( $d$ ) [6]. Nel regime di Mie, ossia quando  $d \gg \lambda$ , si può utilizzare l'ottica geometrica; nel caso opposto,  $d \ll \lambda$ , regime di Raylight, si può considerare la biglia immersa in un campo elettromagnetico uniforme e trattarla come un dipolo sferico con una polarizzabilità  $\alpha$  che dipende dalla dimensione della biglia [4, 11, 20]; se invece  $d \approx \lambda$  si utilizza la teoria generalizzata di Lorenz-Mie

(GLMT) cercando soluzioni delle equazioni di Maxwell, con le opportune condizioni al contorno [7, 8, 9].

**Regime di Raylight** Nel regime di Raylight la dimensione della biglia è molto minore rispetto alla lunghezza d'onda della luce utilizzata per l'intrappolamento. In questa condizione la biglia, immersa in un campo elettromagnetico costante, può essere considerata come un dipolo sferico. Tale approccio è utile, in quanto permette di ottenere delle espressioni separate per la forza di gradiente e la forza di scattering. La forza di scattering per un dipolo sferico immerso in un mezzo con indice di rifrazione  $n_m$  è data da [[4, 10, 11]]:

$$\vec{F}_{scatt} = \frac{n_m P_{scatt}}{c} = n_m \frac{\sigma I_0}{c} \hat{k}, \quad (1.1)$$

dove  $I_0$  è l'intensità del fascio laser,  $c$  è la velocità della luce,  $\hat{k}$  il versore che indica la direzione di propagazione del fascio e  $\sigma$  è la sezione d'urto di scattering che per una particella sferica in tale regime è pari data da

$$\sigma = \frac{128\pi^5 r^6}{3\lambda^4} \left( \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2, \quad (1.2)$$

dove  $m = n_b/n_m$  e  $\lambda$  è la lunghezza d'onda della luce utilizzata [10].

Come si nota da 1.1, la forza di scattering è direttamente proporzionale all'intensità della luce: tale forza sarà quindi più elevata nelle zone di maggiore intensità luminosa.

La forza di gradiente deriva dalla forza di Lorentz che il campo elettromagnetico induce sul dipolo e risulta pari a [11]

$$\vec{F}_{grad} = \frac{2\pi\alpha}{cn_m^2} \vec{\nabla} I_0, \quad (1.3)$$

dove  $\alpha$  è la polarizzabilità della biglia intrappolata, data da

$$\alpha = n_m^2 r^3 \left( \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right). \quad (1.4)$$

Dalle equazioni 1.3 e 1.4 si deduce quindi che la biglia sarà attratta verso le zone di maggiore intensità se  $m > 1$ , ossia se  $n_b > n_m$ .

**Regime di ottica geometrica** Nel caso opposto, quando la dimensione della biglia è molto maggiore della lunghezza d'onda della luce utilizzata, si può descrivere il fenomeno di intrappolamento tramite l'ottica geometrica. In questo regime si può descrivere il fascio luminoso come un insieme di raggi, ognuno caratterizzato da una intensità e da una direzione. Quando un raggio luminoso incide su una biglia non assorbente, viene riflesso e rifratto secondo le leggi di Snell: la quantità di moto iniziale  $\vec{p}_i$  si scompone quindi in quello del raggio riflesso ( $\vec{p}_r$ ) e quello del fascio trasmesso ( $\vec{p}_t$ ). Siccome la quantità di moto dell'intero sistema si deve conservare, si ha che

$$\vec{p}_b = \vec{p}_i - (\vec{p}_r + \vec{p}_t), \quad (1.5)$$

dove  $\vec{p}_b$  è la quantità di moto della biglia, la cui variazione nel tempo corrisponde alla forza che viene esercitata sulla biglia (Fig. 1.2):

$$\frac{d\vec{p}_b}{dt} = \vec{f}_b. \quad (1.6)$$

Considerando il caso in cui tutti i raggi luminosi che compongono il fascio avessero la stessa intensità, la somma dei cambiamenti della quantità di moto di tutti i raggi porterebbe a una forza netta totale nella direzione della luce incidente, ossia la forza di scattering ( $\vec{f}_{scatt}$ ). Il fascio in uscita da un laser presenta tuttavia un profilo gaussiano dell'intensità e ciò significa che i raggi che provengono dal centro del fascio inducono una forza maggiore sulla biglia, rispetto ai raggi nelle zone periferiche. Tale forza, detta forza di gradiente ( $\vec{f}_{grad}$ ), è proporzionale al gradiente dell'intensità nel fascio (Fig. 1.3) e a seconda dell'indice di rifrazione del liquido e della biglia attira o respinge quest'ultima dalla zona di fuoco del fascio laser.

Nel caso infine di un fascio gaussiano fortemente focalizzato, i raggi convergenti sono deviati in maniera tale che la forza di scattering presenta contributi positivi o negativi a seconda della posizione del centro della biglia rispetto

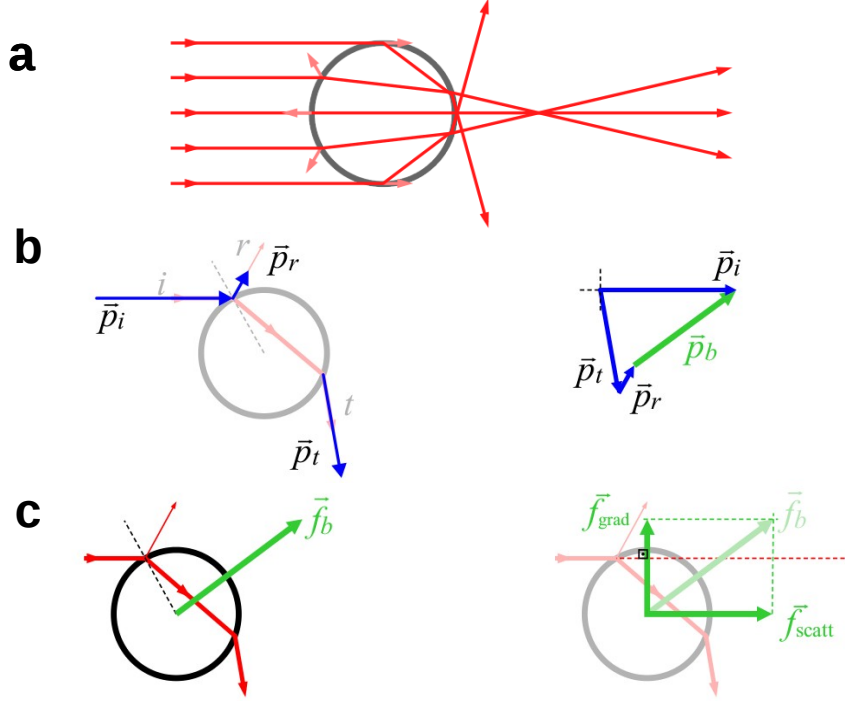


Figura 1.2: **Forze agenti sulla biglia secondo l'ottica geometrica.**[6] (a) Rappresentazione schematica dell'interazione di un fascio collimato con la biglia, secondo l'ottica geometrica. (b) La figura a sinistra rappresenta i vari momenti relativi ai vari raggi riflessi e trasmessi. Quella a destra descrive la conservazione della quantità di moto, con  $\vec{p}_b$  espresso come differenza tra  $\vec{p}_i$  e  $\vec{p}_r + \vec{p}_t$ . (c) La forza esercitata sulla biglia ha quindi lo stesso verso di  $\vec{p}_b$ ; a destra la forza risultante è scomposta nelle componenti  $\vec{f}_{scatt}$  e  $\vec{f}_{grad}$ .

al punto di fuoco; in questa maniera i diversi contributi si compensano e la forza di scattering complessiva risulta trascurabile, permettendo così l'intrappolamento della biglia. Più il fascio è focalizzato, maggiore è la forza di intrappolamento (Fig. 1.1b) a cui la biglia è soggetta.

In genere sperimentalmente si lavora nel regime intermedio tra quelli presentati, in cui  $d \approx \lambda$ ; anche se non fornisce sempre una descrizione dettagliata alla fisica in gioco, l'approccio dell'ottica geometrica permette comunque di ricostruire qualitativamente gli effetti fisici coinvolti nel fenomeno dell'intrappolamento ottico, e può essere utilizzata nel caso di biglie micrometriche



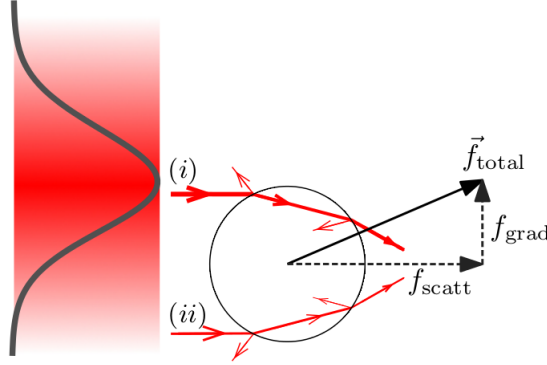


Figura 1.3: **Schema della interazione tra un fascio gaussiano e la biglia [5].** Il raggio proveniente dalla zona centrale del fascio è rappresentato più spesso, ad indicare che farà agire sulla biglia una forza maggiore, verso la zona centrale del fascio.

sottoposte a radiazione elettromagnetica nel visibile o vicino infrarosso, come nel caso di questo lavoro di tesi.

## 1.2 Misura di forze basata sulla conservazione della quantità di moto

Gli strumenti di pinzette ottiche come quello utilizzato nel presente lavoro di tesi hanno il vantaggio di permettere non solo la manipolazione di oggetti micrometrici tramite la luce, ma anche la stima delle forze ad essi applicate durante il loro spostamento. La conservazione della quantità di moto è la chiave per misurare le forze in gioco nell'intrappolamento ottico; la misura della forza viene quindi effettuata andando a rilevare variazioni nella quantità di moto dei raggi luminosi che incidono sulla biglia.

Considerando il flusso di un campo magnetico attraverso una superficie  $A$  che racchiude un volume  $V$ , si può affermare che

$$\frac{d}{dt}(\vec{p}_b + \vec{p}_f) = \vec{\Phi}_f, \quad (1.7)$$

## 1.2 Misura di forze basata sulla conservazione della quantità di moto 13

dove  $\vec{p}_f$  è la quantità di moto del campo elettromagnetico nel volume  $V$  e  $\vec{\Phi}_f$  è il flusso della quantità di moto della radiazione attraverso la superficie  $A$ . Assumendo che il campo sia stazionario nel volume  $V$ , si dimostra che

$$\vec{F} = \frac{d\vec{p}_b}{dt} = \vec{\Phi}_f, \quad (1.8)$$

dove  $\vec{F}$  è la forza esercitata sull'oggetto [6]. Stando alla formula 1.8 si può affermare quindi che la forza esercitata da un campo su un oggetto illuminato è pari al flusso della quantità di moto del campo elettromagnetico che entra in esso.

Il flusso  $\vec{\Phi}_f$  può essere riscritto come

$$\vec{\Phi}_f = \oint_A \vec{\phi}_f da, \quad (1.9)$$

dove  $\vec{\phi}_f$  è la densità della quantità di moto del flusso elettromagnetico, e  $da$  è l'elemento di superficie normale al flusso. Per calcolare la forza bisogna quindi conoscere la densità della quantità di moto del campo elettromagnetico, che si può scrivere come  $\vec{\phi}_f = \frac{n}{c}\vec{S}$ , dove  $n$  è l'indice di rifrazione del mezzo di propagazione,  $c$  è la velocità del campo e  $\vec{S}$  il vettore di Poynting [6].

La forza che agisce sull'oggetto intrappolato risulta quindi pari a

$$\vec{F} = \frac{n}{c} \oint_A \vec{S} da. \quad (1.10)$$

In particolare, la media temporale del vettore di Poynting  $\vec{S}$  non è altro che l'intensità della radiazione di illuminazione  $I$ , che si può misurare con un fotodetector. Andando quindi a rilevare l'intensità della luce dopo l'interazione con un oggetto e la sua distribuzione sul piano del detector, è possibile stimare la forza esercitata sull'oggetto intrappolato, indipendentemente dalle sue caratteristiche fisiche (forma e dimensioni).

### 1.3 Optical Tweezers

Il sistema ottico che permette l'intrappolamento di oggetti di varie dimensioni prende il nome di pinzette ottiche (*Optical Tweezers*). Dal momento che un fascio laser esercita forze dell'ordine dei pN su una biglia e che sono stati sviluppati strumenti per rilevarne spostamenti nanometrici [11, 13, 14], tali sistemi hanno portato a una vera e propria rivoluzione nel campo delle nanotecnologie e della biologia molecolare [12], in cui spostamenti e forze sono dell'ordine di grandezza indicati.

In genere gli studi biologici vengono effettuati su sistemi con una grande quantità di molecole, di cui si studia quindi il comportamento medio, perdendo il dettaglio riguardo la struttura interna delle singole molecole. Per questo motivo risultano molto importanti tecniche che permettano di effettuare esperimenti sulla singola molecola (SME), studiandone le proprietà, caratterizzando la cinetica di determinate reazioni e osservandone le varie configurazioni: le tecniche più utilizzate che permettono anche di rilevare le forze in gioco, sono la microscopia a forza atomica (*Atomic Force Microscopy*, AFM), le pinzette magnetiche (*Magnetic Tweezers*, MT) e le Optical Tweezers (OT) [1, 2].

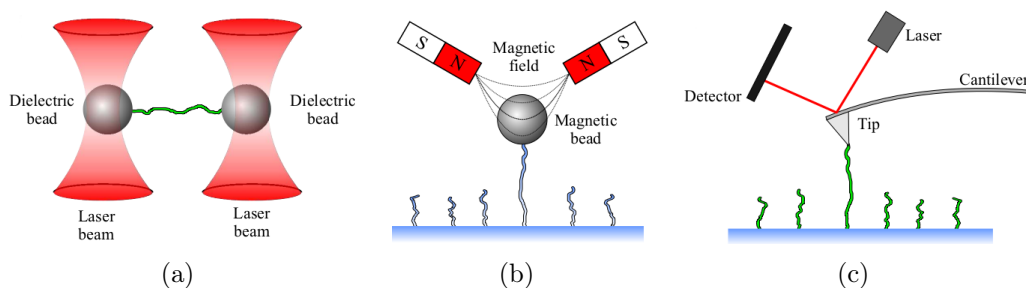


Figura 1.4: **SME**: schemi illustrativi delle tre principali tecniche di manipolazione di singola molecola che permettono anche la rivelazione delle forze agenti su di essa: a) pinzette ottiche (OT); b) pinzette magnetiche (MT); c) microscopia a forza atomica (AFM)

La AFM (Fig. 1.4C) si basa sul principio per cui un'asta la cui punta si muove nelle vicinanze di una superficie, è in grado di rivelare le disomogeneità superficiali deflettendosi di una quantità proporzionale alla distanza

della punta dalla superficie: sfruttando questo principio è possibile effettuare una topografia della superficie. La AFM può inoltre essere utilizzata per effettuare manipolazione di singola molecola: le molecole sono deposte sulla superficie e la punta dell'asta viene ricoperta con altre molecole che possano legarsi a quelle in studio. Avvicinando la punta si forma quindi tale legame con le biomolecole poste sul substrato: monitorando la deflessione dell'asta, nota la sua rigidità, è possibile ricavare una stima della forza che agisce sulla molecola. Questa tecnica è però spesso limitata da interazioni indesiderate tra la punta dell'asta e il substrato. La risoluzione nella forza e nello spostamento raggiunta a temperatura ambiente è di 20 pN e di 2 Å considerando una rigidità dell'asta pari a 100 pN/nm.

Le pinzette magnetiche (Fig. 1.4B) sfruttano il principio che una biglia magnetica risente di una forza se immersa in un campo magnetico non uniforme:  $F = -\mu\nabla B$ . Una biglia è quindi intrappolata in un campo magnetico generato da due magneti. In questo sistema le molecole sono attaccate da un capo alla biglia e all'altro capo ad una superficie di vetro. Le molecole vengono manipolate muovendo il supporto che sostiene i due magneti. è inoltre possibile effettuare torsioni sulla molecola, facendo ruotare i magneti. La rigidità della trappola è molto bassa, pari a  $10^{-4}$  pN/nm, proprietà che determina grandi fluttuazioni nell'estensione della molecola, nell'ordine dei 20 nm.

Le Optical Tweezers (Fig. 1.4A) in questo panorama occupano una posizione intermedia, permettendo di ottenere una migliore risoluzione nella forza (0.1 pN), ma con una rigidità della trappola ( $10^2 - 10^4$  volte minore rispetto alla AFM ) tale da permettere un adeguato controllo del corpo intrappolato. In figura 1.5 si riporta una tabella di confronto delle tre tecniche.

Nei sistemi di Optical Tweezers viene utilizzata luce laser nel vicino infrarosso, focalizzata da un obbiettivo da microscopio a grande apertura numerica, così da creare un gradiente nell'intensità luminosa tale da formare una trappola ottica stabile e, allo stesso tempo, evitare di danneggiare i campioni biologici usati [11]. Vicino al punto di fuoco il potenziale generato dalla trappola ottica è ben approssimato da un potenziale armonico e la forza esercitata dalla trappola si può quindi trattare come una forza elastica, proporzionale allo spostamento dell'oggetto rispetto al centro della trappola.

|                                  | Optical tweezers  | Magnetic tweezers <sup>a</sup>                            | AFM  |
|----------------------------------|---|---|--|
| Spatial resolution (nm)          | 0.1–2   | 5–10 (2–10)   | 0.5–1  |
| Temporal resolution (s)          | 10 <sup>-4</sup>  | 10 <sup>-1</sup> –10 <sup>-2</sup> (10 <sup>-4</sup> )    | 10 <sup>-3</sup>   |
| Stiffness (pN·nm <sup>-1</sup> ) | 0.005–1   | 10 <sup>-3</sup> –10 <sup>-6</sup> (10 <sup>-4</sup> )    | 10–10 <sup>5</sup>   |
| Force range (pN)                 | 0.1–100   | 10 <sup>-3</sup> –10 <sup>2</sup> (0.01–10 <sup>4</sup> ) | 10–10 <sup>4</sup>   |
| Displacement range (nm)          | 0.1–10 <sup>5</sup>                                     | 5 – 10 <sup>4</sup> (5–10 <sup>5</sup> )                  | 0.5–10 <sup>4</sup>  |
| Probe size (μm)                  | 0.25–5  | 0.5–5   | 100–250  |
| Typical applications             | 3-d manipulation<br>Tethered assay<br>Interaction assay | Tethered assay<br>DNA topology<br>(3-d manipulation)      | High force pulling and interaction assays                          |
| Features                         | Low noise and drift dumbbell geometry                   | Force clamp<br>Bead rotation<br>Specific interactions     | High resolution imaging  |
| Limitations                      | Photodamage<br>Sample heating<br>Non specific           | No manipulation (Force hysteresis)                        | Large high- stiffness probe<br>Large minimal force<br>Non specific |

<sup>a</sup>Values for electromagnetic tweezers are shown in parenthesis

Figura 1.5: **Confronto SME [2]:** confronto tra microscopia di forza atomica, pinzette magnetiche e pinzette ottiche.

Per poter esercitare le forze desiderate sul sistema biologico in esame è necessario poterne manipolare in maniera controllata le estremità. La procedura generalmente più usata consiste nel fissare i due capi della molecola a due superfici, funzionalizzate biochimicamente, delle quali una è mantenuta fissa. La superficie mobile è solitamente data da una biglia di materiale dielettrico e di dimensioni micrometriche, la quale viene intrappolata nella trappola ottica e movimentata otticamente. La seconda superficie può essere una parete della camera microfluidica in cui gli esperimenti vengono realizzati (Fig. 1.6a) o una seconda biglia mantenuta fissa per suzione sulla sommità di una micropipetta (Fig. 1.6b). Nelle pinzette ottiche a doppia trappola, invece, la seconda superficie è anch'essa una biglia la quale può essere a sua volta movimentata otticamente (Fig. 1.6c) [15, 16, 17].

Variando la distanza relativa tra le due superfici è quindi possibile esercitare delle forze sulla molecola in esame, studiando diversi fenomeni biologici, come ad esempio il ripiegamento proteico, l'*unzipping* del DNA o i movimenti di un motore molecolare. Dall'analisi delle forze in gioco è poi possibile determinare importanti parametri fisici tipici del sistema studiato, come le costanti cinetiche e le energie libere della molecola.

Per rilevare tali forze nel presente lavoro sono stati utilizzati dei *Position*

*Sensitive Detectors* (PSD), che permettono di rilevare spostamenti dell'ordine del decimo di nm. I valori forniti da questi sensori vengono trasformati in valori di posizione e di forza tramite un'opportuna calibrazione. Una trattazione approfondita del sistema sarà svolta nel capitolo successivo.

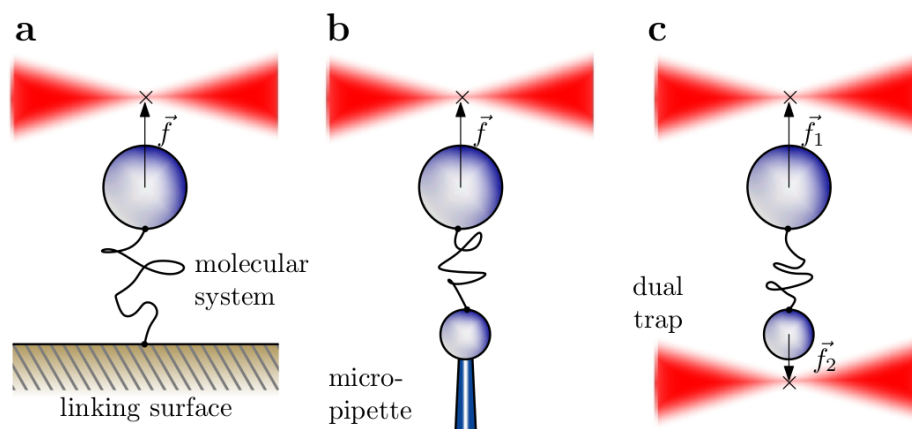


Figura 1.6: **Diversi set-up per Optical Tweezers.**[5] **(a)** *Singola trappola e superficie di ancoraggio*: la molecola è fissata chimicamente ad una superficie da un capo, mentre sull'altro è attaccata a una biglia, che viene intrappolata otticamente. Muovendo la trappola e cambiando quindi la distanza tra la biglia e la superficie si possono esercitare forze sulla molecola. **(b)** *Singola trappola e micropipetta*: alla molecola sono attaccate due biglie, una fissata alla micropipetta per suzione, l'altra intrappolata otticamente. Le forze sulla molecola si esercitano cambiando la distanza tra le biglie. **(c)** *Doppia trappola*: alla molecola sono attaccate due biglie, ciascuna intrappolata in una trappola ottica. Muovendo le due trappole si varia la distanza tra le due biglie.



# Capitolo 2

## Set-up sperimentale

Il sistema utilizzato nel presente lavoro di tesi, conosciuto come *mini-tweezers* è stato sviluppato dal gruppo di Steve B. Smith e Carlos Bustamante della University of California nel 2003 [18, 19, 20].

Il nome deriva dal fatto che questo set-up sperimentale è particolarmente compatto, più stabile e con una migliore risoluzione rispetto ai convenzionali Optical Tweezers (Fig. 2.1(a), 2.1(b)). Il controllo dello strumento e la misura dei segnali avviene attraverso delle schede elettroniche con microcontrollori PIC, che comunicano tramite porta USB a un computer Mac (Fig. 2.1(c), 2.1(a)).

### 2.1 Descrizione dell'apparato di misura

Il sistema di misura è rappresentato schematicamente in figura 2.2.

L'esperimento avviene all'interno di una camera microfluidica. Il sistema molecolare in studio viene intrappolato secondo la geometria rappresentata in figura 1.6(b) e riportata nella foto 2.1(d): alle estremità del sistema biologico sono fissate due biglie di cui una viene ancorata tramite suzione all'estremità di una micropipetta e l'altra viene intrappolata dalla trappola ottica creata da due fasci laser contropropaganti.



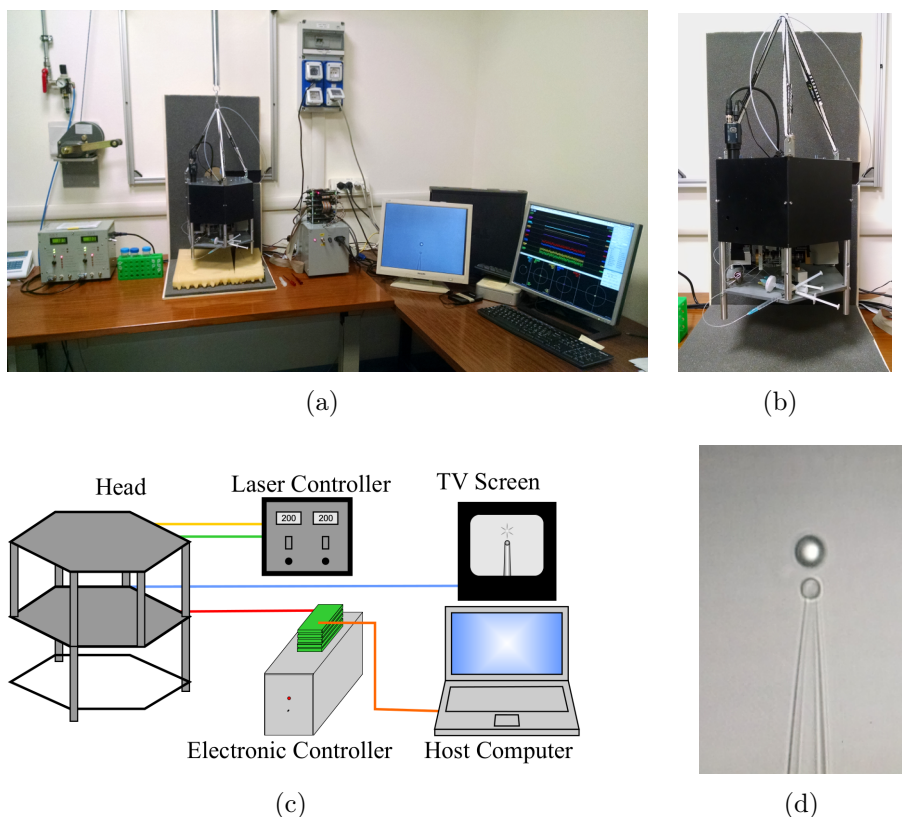


Figura 2.1: **Mini-tweezers.** (a) Foto del sistema mini-tweezers utilizzato; (b) schema generale del set-up [6]; (c) foto della geometria utilizzata durante l'esperimento.

### 2.1.1 Laser e trappola ottica

La trappola ottica è generata da due fasci laser contropropaganti, di lunghezza d'onda pari a 805 nm e potenza variabile fino a 200 mW, che seguono un percorso speculare all'interno dello strumento.

I fasci sono generati da due laser a diodo (Lumics SN0834770): la luce prodotta entra in una fibra ottica monomodale, che fornisce la componente trasversale del campo elettromagnetico; il fascio prodotto ha quindi un profilo gaussiano ed è polarizzato linearmente. L'intensità e la temperatura dei laser sono monitorati da un apposito sistema di controllo.

Nel caso di una trappola generata da un singolo laser è necessario focalizzare il fascio con obiettivi con grande apertura numerica (NA), così che la forza

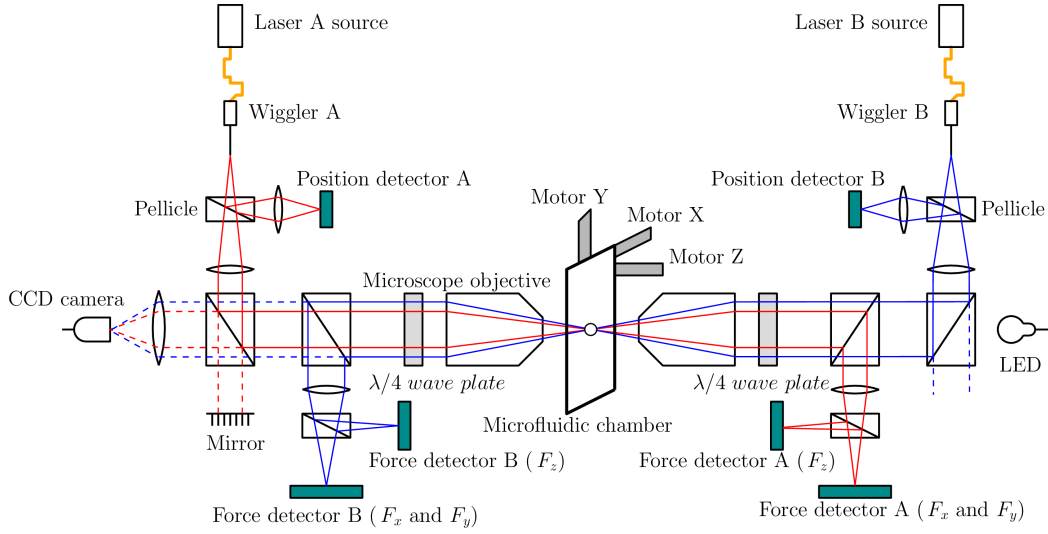


Figura 2.2: **Schema del mini-tweezer I** due laser contropropaganti sono indicati in due colori diversi, rosso e blu.

di gradiente vinca su quella di scattering. In questa condizione è però difficile riuscire a raccogliere tutta la luce deflessa dal corpo intrappolato, rendendo quindi più difficoltosa la misura della forza basandosi sulla variazione del momento dei raggi luminosi. Al contrario, l'utilizzo di due fasci contropropaganti permette di ovviare a questo problema e di ottenere una trappola più stabile: infatti, nel caso di due fasci contropropaganti le forze di scattering lungo la direzione di propagazione si compensano, ed essendo la forza di gradiente l'unica agente sulla biglia, non è più necessario utilizzare obbiettivi con grande NA. Questo fatto permette di raccogliere in maniera efficiente la luce deflessa dalla biglia (più del 95%) ed inoltre permette di ridurre in maniera notevole possibili effetti di aberrazione sferica derivati dalle lenti. Inoltre, dalla teoria dei fasci gaussiani si sa che maggiore è il diametro del fascio, maggiore sarà la profondità di fuoco, permettendo di avere il fascio focalizzato in tutta la profondità della camera microfluidica, riducendo gli effetti idrodinamici delle pareti della camera sulla biglia intrappolata nella trappola ottica. Infine, il fatto che in questa configurazione non sia richiesta una forte focalizzazione del fascio riduce il riscaldamento del mezzo (acqua) per assorbimento nell'infrarosso [6].

### 2.1.2 Percorso del fascio

Dal momento che i due fasci percorrono lo stesso percorso in maniera simmetrica, per semplicità e chiarezza in seguito verrà descritto solo quello di un singolo fascio.

Come accennato sopra, la luce in uscita dal laser entra in una fibra ottica monomodale. La fibra ottica è manovrata da un sistema chiamato *wiggler* che ne permette lo spostamento tramite dei cristalli piezoelettrici. Il *wiggler*, rappresentato in figura 2.3 è formato da due tubi concentrici ancorati a un blocco fisso: la fibra ottica è fissata sia al tubo interno (in un punto chiamato di *pivot*), più corto, e incollata all'estremità di quello esterno, più lungo; all'uscita dei tubi la fibra rimane scoperta. Due attuatori piezoelettrici muovono perpendicolarmente il tubo esterno in una zona allargata al suo centro, determinando un movimento dell'estremità della fibra, con il punto di *pivot* come perno. Come si può osservare in figura 2.3b, un movimento della fibra determina di fatto lo spostamento della trappola ottica.

Il fascio, in uscita dalla fibra, incontra una pellicola che riflette il 5% del-

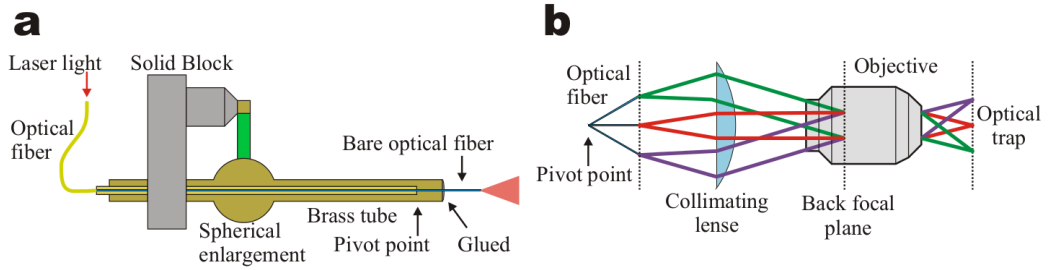


Figura 2.3: Il *wiggler*[6]. Quando l'attuatore piezoelettrico, rappresentato in verde, spinge sul rigonfiamento, si muove anche la fibra.

la luce verso un sensore di posizione (Position Sensitive Detector, PSD) chiamato *light-lever* che fornisce informazioni sulla posizione della trappola ottica. Prima di arrivare al PSD la luce attraversa una lente asferica, che permette di focalizzare il fascio senza introdurre aberrazioni.

Il rimanente fascio trasmesso viene collimato da una lente e incontra un *Polarizing Beam Splitter* (PBS) che lo riflette completamente, selezionando luce

polarizzata orizzontalmente che subito dopo verrà convertita in un'onda con polarizzazione circolare da una lamina a quarto d'onda ( $\lambda/4$ ). La luce viene quindi focalizzata da un obiettivo a immersione (Olympus UPLSAPO 60xW, NA=1.2) in un punto focale interno alla camera microfluidica. Utilizzare luce polarizzata circolarmente garantisce che la forza che agisce sulla biglia non dipenda dalla polarizzazione della luce incidente.

La luce che fuoriesce dalla parte opposta della camera microfluidica viene raccolta da un secondo obiettivo - uguale al primo - e polarizzata verticalmente da una seconda lamina  $\lambda/4$ . Incontra quindi due PBS: viene completamente trasmessa dal primo, mentre il secondo la riflette, direzionandola verso i sensori di posizione e forza. Dopo aver incontrato una lente di *relay*, il fascio incide su un *Beam Splitter*: parte della luce viene riflessa verso un PSD che fornisce le componenti trasverse - x e y - della forza ( $F_x, F_y$ ); la luce rimanente è trasmessa verso un secondo sensore che misura la componente lungo l'asse ottico - z - della forza ( $F_z$ ).

La polarizzazione prima orizzontale e poi verticale del fascio garantisce la non interazione dei due fasci nei tratti in cui si trovano su percorsi sovrapposti [6, 5].

### 2.1.3 Sensori di posizione e forza

Il rilevamento della posizione della trappola (*light-lever*) e dei valori di  $F_x$  e  $F_y$  avvengono tramite sensori PSD (PSI Optoelectronics, DL-10), che forniscono un segnale di corrente proporzionale allo spostamento del centroide dello spot luminoso che colpisce l'area attiva. Un PSD in sostanza è un diodo PIN, a cui sono attaccati due *layer* conduttivi, collegati a 4 elettrodi (Fig. 2.4). Quando un fotone colpisce la zona intrinseca, viene prodotta una coppia elettrone-lacuna, i quali viaggiano in direzione opposta, verso i rispettivi layer conduttivi: l'eccesso di carica causato dall'arrivo di molti fotoni viene raccolto dagli elettrodi come segnale di corrente.

La corrente raccolta è proporzionale alla distanza tra il punto su cui ha inciso il fascio e l'elettrodo: questa proprietà consente quindi di rilevare la posizione del fascio sul detector.

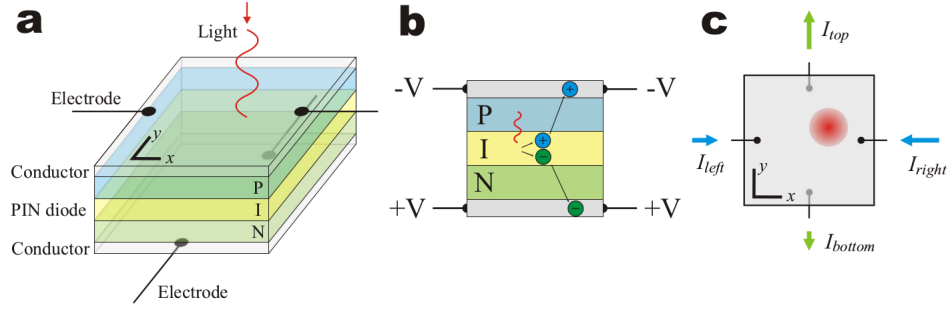


Figura 2.4: **Position Sensitive Detector [6]**. Il PSD è un diodo PIN (a). L'arrivo di un fotone genera una coppia elettrone lacuna, che viaggia verso gli elettrodi opposti (b). Le correnti prodotte negli elettrodi dipendono dalla posizione in cui incide il fascio luminoso (c).

Detta  $S$  l'area attiva del detector, si possono scrivere le seguenti relazioni che legano l'intensità della luce incidente ( $E(x, y)$ ) ai segnali di corrente sui vari elettrodi del PSD ( $I_{left}$ ,  $I_{right}$ ,  $I_{top}$ ,  $I_{bottom}$ ):

$$I_{left} - I_{right} \propto \int_S x E(x, y) dS \quad (2.1)$$

$$I_{top} - I_{bottom} \propto \int_S y E(x, y) dS \quad (2.2)$$

$$I_{left} + I_{right} = I_{top} + I_{bottom} \propto \int_S E(x, y) dS \quad (2.3)$$

I rapporti tra le due differenze di corrente 2.1 e 2.2 e la somma 2.3 forniscono la posizione di incisione del fascio in  $x$  e in  $y$ : tale normalizzazione garantisce il fatto che la calibrazione in forza del detector che verrà successivamente descritta non dipenda dalla potenza del laser utilizzata.

La posizione in  $z$  viene invece ricavata antepponendo un filtro *bulleye* a un fotodiodo (OSI Optoelectronics, PIN-10DI): il detector rivelerà una potenza che dipende dalla dimensione dell'area colpita dal fascio, che varia a seconda dalla posizione in  $z$  della biglia. Ci si riferirà a tale sistema col termine *IRIS*. Il processo di rilevazione della diversa posizione della trappola e della biglia intrappolata nelle tre direzioni -  $x$ ,  $y$  e  $z$  - è schematizzato in figura 2.5 sfruttando semplici regole dell'ottica geometrica.

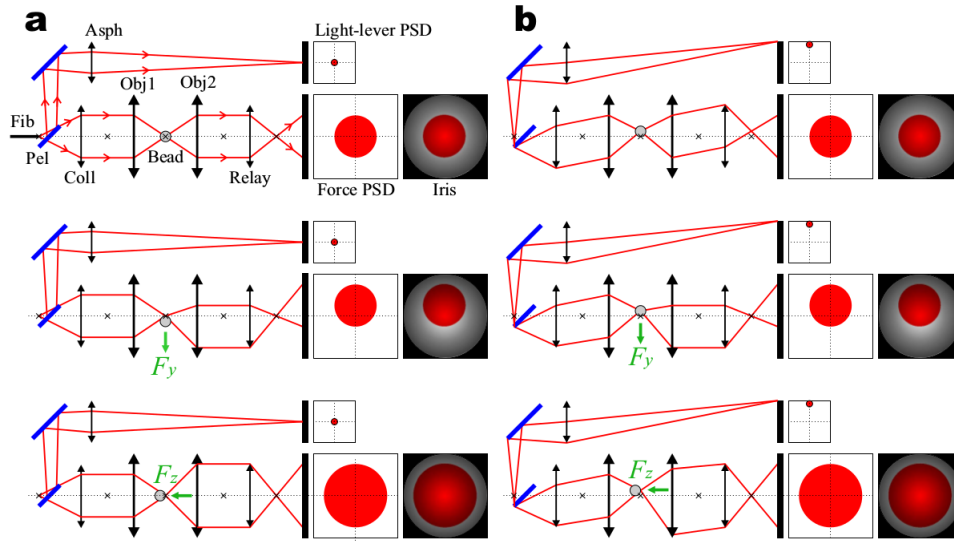


Figura 2.5: **Tracciamento del sistema di rilevazione [6]**: Nelle immagini sono riportate varie situazioni con diversa posizione della trappola ottica e della biglia. In (a) la trappola ottica è al centro e sono rappresentate in alto la situazione di forza nulla, al centro l'azione di una forza lungo y e in basso una forza lungo z; in (b) sono rappresentate le stesse situazioni, ma con la trappola ottica in una posizione diversa.

Il sistema prevede la raccolta di tre segnali: la posizione della trappola ottica tramite il light-lever, i valori di forza lungo x e y tramite un PSD e quelli lungo l'asse z tramite l'IRIS. Nella situazione di forza nulla la biglia riflette il fascio laser in maniera simmetrica nel piano (x,y) e pertanto la distribuzione dell'intensità del fascio rivelato risulta centrata sull'area attiva del PSD, il quale rileva una forza nulla (Fig. 2.5a in alto). Con la presenza invece di una forza lungo y, la biglia si sposta rispetto al centro della trappola, deflettendo quindi la luce in maniera asimmetrica nel piano (x,y). Ciò si traduce in uno spostamento del fascio di luce rispetto al centro del PSD, il quale rileva otticamente la presenza di una forza. Nel caso infine di una forza lungo z, il fascio di luce che colpisce il detector presenta un'area di diametro maggiore o minore rispetto alla situazione in assenza di forza: davanti al detector è posto un filtro *bulleye* che lascia inalterata l'intensità dei raggi che passano nel suo centro, mentre attenua quelli fuori asse, permettendo di rilevare le

variazioni del diametro della luce incidente.

Come si può osservare in figura 2.5b, quanto descritto non dipende dalla particolare posizione della trappola. Pertanto, anche se quest'ultima viene movimentata ma la biglia non è soggetta a forze esterne, non vi sarà alcuna variazione nella posizione o dimensione del fascio di luce incidente sui detector e il sistema non rivelerà pertanto la presenza di forze.

Si noti che il sistema ottico deve essere opportunamente allineato, per evitare artefatti di misura: ad esempio, se il PSD fosse posizionato troppo vicino o troppo lontano dalla lente di relay, il valore della forza dipenderebbe dalla posizione della trappola ottica. L'allineamento del sistema è quindi effettuato in maniera tale che la posizione della trappola sia legata all'angolo tra il fascio collimato e l'asse ottico e che i valori di forza lungo x, y e z siano proporzionali allo spostamento dell'oggetto rispetto al centro della trappola ottica.

Se il sistema è allineato correttamente ogni sensore sarà sensibile a una sola di queste informazioni, che potranno quindi essere raccolte separatamente.

### 2.1.4 Sistema di imaging

Il sistema sperimentale costituito dalla biglia intrappolata otticamente e dalla micropipetta viene visualizzato grazie a un sistema di imaging costituito da una luce LED blu ( $\lambda = 470$  nm) e una camera CCD (Watec WAT-902H3 SUPREME). La luce di illuminazione passa attraverso una lente che permette di ottenere la condizione di Köhler, illuminando in maniera uniforme l'oggetto in studio, posto in questo caso sul piano focale dei due obbiettivi. L'immagine viene proiettata tramite un'altra lente sul CCD della camera, che rileva luce nel vicino infrarosso, così da poter vedere sia i laser, all'occorrenza, sia l'esperimento (micropipetta e biglie). Quando la biglia viene intrappolata dal fascio laser, le immagini dello spot luminoso e della biglia sono sovrapposte: la luce del fascio satura però la zona del CCD che colpisce, rendendo impossibile la visione della biglia. Per evitare ciò prima della camera è posto un filtro infrarosso, che permette di oscurare il fascio durante l'esperimento.

### 2.1.5 Camera microfluidica

L'esperimento viene condotto all'interno di una camera microfluidica inserita tra i due obbiettivi a immersione (acqua).

La camera è costituita da due coprivetrini (24 mm x 60 mm x 150  $\mu\text{m}$  ognuno) tra i quali sono posti due strati di parafilm, opportunamente tagliato così da formare tre canali paralleli, come mostrato in figura 2.7: tra i due strati di parafilm sono inseriti i tubi dispensatori e la micropipetta. L'assemblamento della camera è realizzato tramite fusione del parafilm su una piastra a circa 90 °C. Il taglio del parafilm è stato realizzato con un Cutter (Graphtec Craft Robo CC200-20), su un disegno realizzato in AutoCAD (Fig. 2.6), che prevede un canale centrale situato tra due canali laterali.

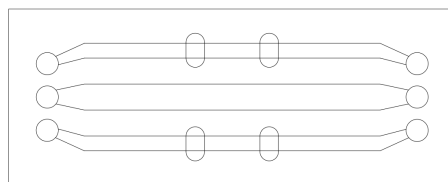


Figura 2.6: **Taglio del parafilm:** disegno realizzato in AutoCad per il taglio del parafilm posto tra i due coprivetrini composti a formare la camera microfluidica.

Come mostrato in figura 2.7(b), i canali laterali sono messi in comunicazione tramite dei tubi dispensatori (King Precision Glass, Inc., ID ( $0.04 \pm 0.006$ ) mm, OD ( $0.10 \pm 0.01$ ) mm), mentre la micropipetta è posta al centro della camera, in maniera tale che la sua punta sia al centro del canale centrale. La micropipetta è stata realizzata tramite uno strumento chiamato *Pipet Puller* a partire da tubi simili a quelli dispensatori, ma di spessore minore (King Precision Glass, Inc., ( $0.04 \pm 0.006$ ) mm, OD ( $0.08 \pm 0.01$ ) mm). Su uno dei due coprivetrini sono realizzati dei fori in corrispondenza delle estremità dei canali per permettere l'inserimento e la fuoriuscita del buffer, del materiale biologico e delle biglie.

**Foratura dei vetrini** Per la realizzazione dei fori sono state utilizzate due sabbiatrici presenti al Dipartimento di Fisica e Astronomia di Padova: i ri-



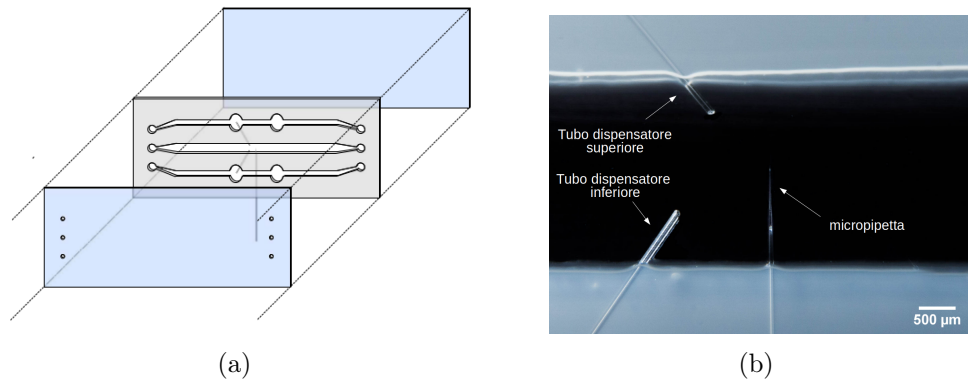


Figura 2.7: **Camera microfluidica:** Rappresentazione dell'assemblamento della camera fluidica (a) e foto della zona centrale, dove avviene l'esperimento (b).

sultati ottenuti sono stati confrontati al fine di trovare i parametri (tipologia di sabbia, potenza e sezione del getto) che permettessero di ottenere dei fori precisi, della dimensione desiderata e con il minor danneggiamento del copri-ve-trino. La dimensione dei fori deve essere minore del diametro esterno dei tubi con cui verranno messi in corrispondenza durante il montaggio della camera sul supporto (si veda il prossimo paragrafo): nel caso dei tubi utilizzati in questo lavoro di tesi, i fori devono avere un diametro  $< 3$  mm.

È stata utilizzata una sabbiatrice Dentalfarm (dry oxide WAFIS, alluminia-bis, DENTALFARM) (Fig. 2.9(a)), che spara ossido di alluminio ( $Al_2O_3$ , Fig. 2.9(c),  $50-60 \mu m$ ) in una range di pressione fino a 6 bar, e una pallinatrice (pallinatrici NORBLAST)(Fig. 2.9(b)) che lavora con pressioni fino a 12 bar, che utilizza microsfe-re di vetro (Fig. 2.9(d),  $200-300 \mu m$ ). Le due sabbiatrici differiscono anche per la sezione del getto di sabbia emesso: la prima presenta un diametro di circa 1 mm, mentre la seconda di circa 8 mm.

La sabbiatura è avvenuta utilizzando un'opportuna maschera di allumi-nio, in maniera tale che l'allumina incidesse solo sulla parte di vetrino inte-ressata, evitando di danneggiare la parte centrale dove avviene l'esperimento, che deve essere ben visibile tramite il sistema di imaging e pertanto perfet-tamente trasparente. La maschera presenta quindi dei fori in corrispondenza delle zone dove si vuole bucare il coprivetrino, di diametro di massimo 1 mm. Il progetto di tale maschera, realizzato in AutoCAD, è riportato in figura

2.8.

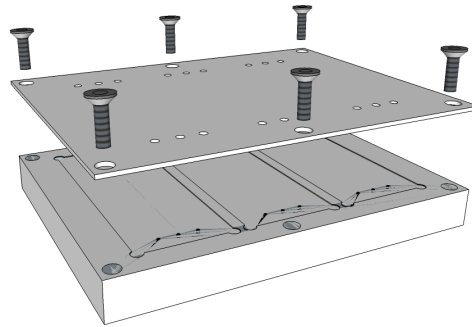


Figura 2.8: **Maschera per sabbiatrice:** disegno della maschera che è stata progettata per l'utilizzo della sabbiatrice, così da forare solamente le zone del coprivetrino esposte alla sabbia.

Il confronto dei risultati ottenuti con le due sabiatrici è mostrato in figura 2.9, sotto la foto della corrispondente sabbia utilizzata.

Come atteso, l'utilizzo di sabbia più sottile consente di realizzare dei fori molto più precisi: in particolare, i fori ottenuti con le microsfere di vetro, oltre ad avere un contorno meno lineare, spesso presentavano delle crepe (come si nota in Fig. 2.9(f) e 2.9(h)) che causavano la rottura del coprivetrino in fase di assemblamento della camera microfluidica. L'alone presente in figura 2.9(e) è dato da allumina entrata nella maschera nei pressi dei fori: tale difetto non comporta un eccessivo danneggiamento del vetrino e non ostacola il corretto funzionamento della camera.

La variazione della pressione di uscita del getto incide principalmente sulla velocità di formazione del foro: se da un lato è preferibile ridurre i tempi di realizzazione dei fori, dall'altro pressioni eccessivamente elevate producono un danneggiamento del vetrino nei pressi dei fori.

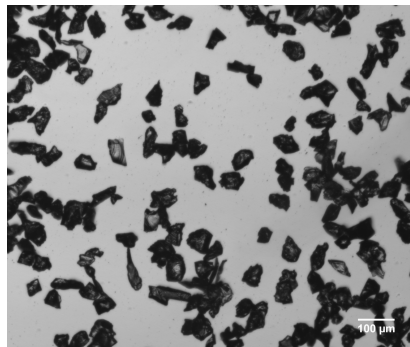
Confrontando i risultati ottenuti con le due tecniche, si è deciso di utilizzare la sabbiatrice ad allumina (dry oxide WAFIS, alluminia-bis, DENTALFARM), che permette di creare dei fori in maniera precisa e in tempi ragionevoli (circa 50 sec a foro), senza compromettere il successivo funzionamento del coprivetrino.



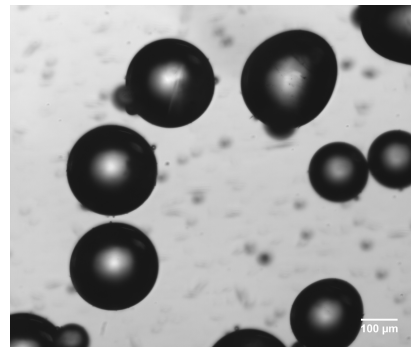
(a)



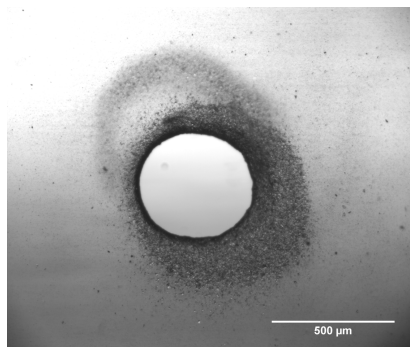
(b)



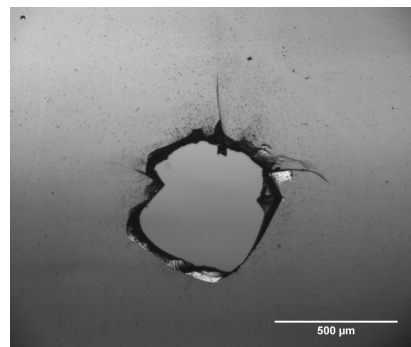
(c)



(d)



(e)



(f)



(g)



(h)

Figura 2.9: **Foratura dei vetrini:** in (a) e (b) sono riportate le foto delle due sabbiatrici utilizzate, la dry oxide WAFIS, alluminia-bis, DENTALFARM a sinistra e la pallinatrice NORBLAST a destra; in (c) e (d) vi è il confronto fra la allumina e le microsfele di vetro; in (e-f), (g-h) sono riportati i risultati ottenuti, rispettivamente con la sabbiatrica ad allumina e microsfele.

**Supporto della camera e microfluidica** La camera microfluidica viene montata su un opportuno supporto, che permette di posizionarla in mezzo ai due obiettivi nell' Optical Tweeters, in una posizione tale che il centro del canale centrale si trovi nella zona in cui i due fasci contropropaganti vengono focalizzati. La posizione del supporto - e della camera - una volta montato può essere variata utilizzando dei motori che permettono movimenti lungo x, y e z.

Il supporto, riportato in figura 2.10, presenta dei fori con filettatura, nei quali vengono fissati dei connettori di plastica, anch'essi filettati, in cui vengono inseriti i tubi d'entrata e d'uscita (Fig. 2.10(b)): il centro di questi connettori, in fase di montaggio della camera, deve essere posto in perfetta corrispondenza con i fori realizzati sul coprivetrino, in maniera tale che il materiale inserito dai tubi d'entrata possa fluire senza ostacoli all'interno della camera e uscire verso il contenitore di scarti.

La camera viene fissata al supporto tramite dei blocchetti di plexiglass, ancorati con delle viti (Fig. 2.10(a)).

La parte finale della micropipetta è inserita in un tubo e fissata con del NOA 68 (THORBLAST); come rappresentato in figura 2.11, il tubo è collegato alla siringa contenente aria con cui si effettuerà la suzione della biglia.

Come rappresentato in figura 2.11 il buffer, le biglie e il sistema biologico vengono inserite nei canali tramite delle siringhe e dei tubi; nel lato opposto i fluidi in uscita confluiscono verso un contenitore di raccolta. All'entrata del canale centrale viene inserito un filtro (VWR International, 0.2  $\mu\text{m}$  PTFE) per evitare di contaminare la zona in cui avvengono gli esperimenti. La micropipetta è collegata a una siringa riempita di aria, che viene utilizzata per immobilizzare per suzione la biglia sulla punta.

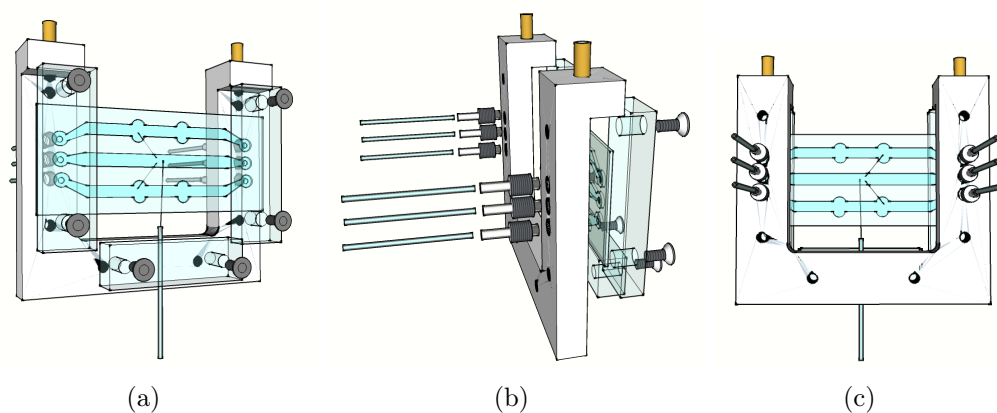


Figura 2.10: **Montaggio della camera microfluidica:** Il disegno riporta tre visuali del portacameretta con montata la camera microfluidica. In (a) sono rappresentati i blocchi di plexiglass con cui viene fissata la camera. La parte finale della micropipetta è inserita in un tubo, collegato alla siringa piena d'aria (Fig. 2.11). In (b) si possono osservare i connettori filettati, in cui vengono inseriti i tubi d'entrata. I tubi rappresentati nelle tre figure proseguono e sono collegati alle siringhe da un lato e al contenitore degli scarti dall'altro, come rappresentato in figura 2.11.

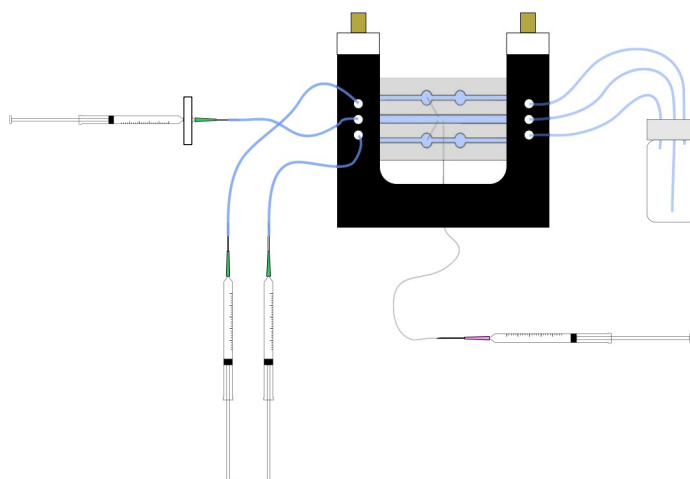


Figura 2.11: **Schema della camera microfluidica:** in figura è rappresentata la camera microfluidica montata sul supporto, con le siringhe per inserire il materiale a sinistra e il contenitore per i fluidi in uscita a destra. Sulla siringa del canale centrale è rappresentato il filtro.

**Pipet Puller** Il Pipet Puller, rappresentato in figura 2.12(a) è uno strumento che permette di realizzare delle pipette con punta micrometrica usando dei capillari di vetro. Il principio di funzionamento consiste nella fusione del capillare e nel suo contemporaneo allungamento per effetto della gravità.

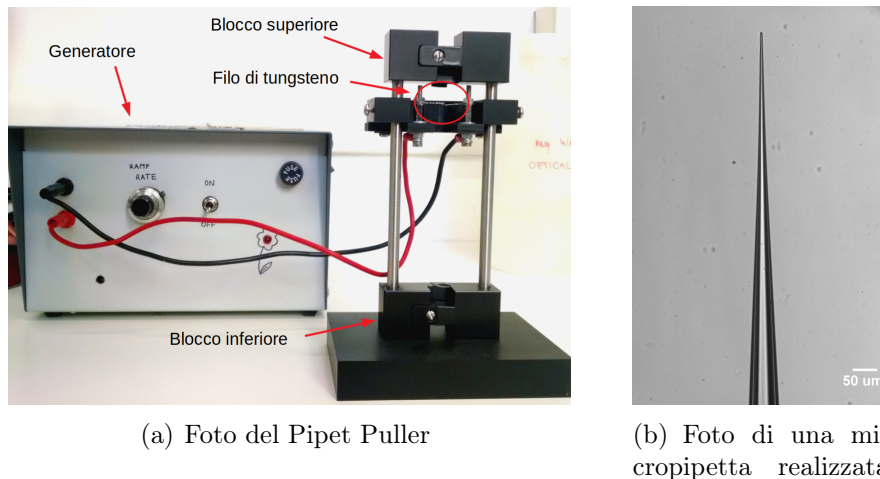


Figura 2.12: **Pipet Puller**: foto dello strumento e di una micropipetta realizzata nelle condizioni ottimali.

Il sistema è costituito da un filo di tungsteno arrotolato in due spire collegato ad un generatore che permette di applicare alle sue estremità una differenza di potenziale di 1.5 V: in tal modo il filo viene percorso da corrente e per effetto Joule si surriscalda fino a diventare incandescente e aumentare sensibilmente la temperatura nella zona racchiusa tra le spire. Tale aumento di temperatura può essere sfruttato per fondere sottili capillari di vetro, permettendone il taglio e al contempo la modellazione. Il capillare viene fatto passare all'interno delle spire e fermato su due blocchi, uno superiore, fissato al sistema, e uno inferiore appeso al capillare stesso e libero di cadere per gravità. Quando il filo di tungsteno diventa incandescente inizia a fondere il capillare, la cui estremità inferiore viene trascinata verso il basso dal blocco sottostante, provocandone la rottura e la contemporanea modellazione a forma di micropipetta, come rappresentato nella foto 2.12(b).

Il generatore utilizzato può essere assimilato a un circuito RC in cui la tensione varia da 0 a  $(1.65 \pm 0.04)$  V e la cui costante di tempo caratteristico può

essere variata tramite un potenziometro: i valori impostati su tale potenziometro (*ramp rate*,  $r$ ) sono inversamente proporzionali al tempo di salita del circuito RC ( $\tau$ ), come mostrato in tabella 2.1 e in figura 2.13.

| $r$ (a.u.) | $\tau$ (s)      |
|------------|-----------------|
| 1          | $29.3 \pm 0.3$  |
| 2          | $16.3 \pm 0.1$  |
| 4          | $8.8 \pm 0.1$   |
| 6          | $6.98 \pm 0.06$ |
| 8          | $5.82 \pm 0.06$ |
| 10         | $5.22 \pm 0.06$ |

Tabella 2.1

Impostando quindi bassi valori del *ramp rate* la corrente nel filo di tungsteno aumenta lentamente, per alti valori di  $r$  invece in maniera molto più rapida.

La dimensione e la forma della punta ottenuta variano a seconda del valore di  $r$  impostato e della posizione reciproca tra le due spire. Sulla punta della pipetta durante gli esperimenti viene fissata per suzione una biglia di dimensione di circa  $2 \mu\text{m}$ : è quindi importante realizzare micropipette con un diametro interno di dimensioni minori e con la punta aperta. I

vari parametri in gioco del pipet puller sono stati quindi opportunamente calibrati al fine di ottenere punte con le caratteristiche desiderate.

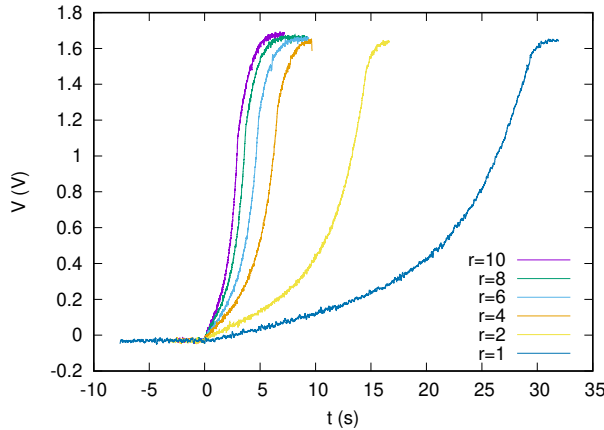


Figura 2.13: **Tensione ai capi del filo di tungsteno:** si riportano le curve di salita della tensione misurata ai capi del filo di tungsteno, per diversi valori di  $r$  impostati. Tali dati sono stati raccolti tramite un oscilloscopio ed elaborati con il software Origin.

La variazione della distanza tra le spire incide notevolmente sulla dimensione finale della punta della micropipetta: se è elevata, si ottengono diverse misure del diametro della punta al variare di  $r$ ; in particolare, quanto maggiore è  $\tau$ , tanto più larga è la punta che si ottiene. Se invece le due spire sono vicine tra loro, allora si ottengono punte con diametro interno di circa  $1 \mu\text{m}$  per ogni valore di  $r$  impostato.

Si è quindi scelta una configurazione tale per cui le spire fossero vicine e,

impostando il valore massimo di ramp rate, si sono ottenute micropipette con un diametro interno medio di circa  $1\text{ }\mu\text{m}$  2.12(b).

## 2.2 Calibrazione dell'apparato

### 2.2.1 Calibrazione in tempo

La misura del tempo deriva da un orologio interno al sistema elettronico di acquisizione: il microprocessore manda periodicamente un pacchetto di dati al computer a una frequenza di 1 kHz. Una delle variabili trasferite è un numero di 32-bit (*CycleCount*) che aumenta di una unità ogni volta che il microprocessore ha completato un ciclo. Ad ogni pacchetto di dati trasferito corrisponde quindi un tempo pari a  $1/1\text{kHz} = 1\text{ ms}$ . Il sistema di acquisizione calcola quindi il tempo secondo il rapporto

$$[Tempo] = \frac{[CycleCount]}{Frequenza}.$$

### 2.2.2 Calibrazione della posizione della trappola

La calibrazione relativa alla posizione della trappola ottica deriva a sua volta dalla calibrazione dei motori agenti sulla camera microfluidica.

La conversione della posizione angolare dell'asse rotante del motore in impulsi elettrici è effettuato da un trasduttore di posizione angolare, detto anche *encoder*. A seconda della direzione del motore, ad ogni impulso un numero di 24-bit registrato da ognuno dei tre motori (*CounterX, Y, Z*) aumenta o diminuisce di una unità.

Stando alle specifiche dei motori utilizzati, Thorlabs Z806V (per gli spostamenti in z e y) e Thorlabs Z606V (per gli spostamenti in x), sono necessari rispettivamente 512 e 48 impulsi perchè la vite del motore compia un intero giro. L'asse principale del motore è a sua volta collegata a un'altra vite (vite principale), che agirà direttamente sul supporto della camera, muovendolo avanti e indietro. Per compiere un'intera rotazione della vite principale, sono necessari rispettivamente 67 e 256 rotazioni del motore. Per ogni giro della



vite sono quindi necessari  $512 \times 67$  e  $48 \times 256$  impulsi, rispettivamente. Per ricavare la conversione tra numero di impulsi e spostamento del supporto della camera, basta quindi dividere il passo della vite (rispettivamente 1 mm e 0.5 mm) per il numero totale di impulsi necessari per compiere un giro della vite e si ottiene

$$\frac{1.0mm}{512 \cdot 67} = 29 \frac{nm}{pulse}$$

per i motori in z e y, e

$$\frac{0.5mm}{48 \cdot 256} = 41 \frac{nm}{pulse}$$

per il motore in x.

Una volta nota la conversione del movimento del motore della camera in  $\mu m$ , si può procedere con la calibrazione della posizione della trappola.

La calibrazione della posizione della trappola avviene nella seguente maniera: una biglia è fissata per suzione sulla punta della micropipetta e si pone la trappola ottica su essa, impostando una forza costante nulla tramite il meccanismo di feedback del sistema. In questa maniera, se si sposta la micropipetta, la trappola seguirà il centro della biglia, per mantenere la forza pari a zero. Dal momento che la forza non è ancora calibrata il valore effettivo impostato non sarà nullo, ma un numero arbitrario che il sistema registra: l'importante è che tale valore sia mantenuto costante dal sistema di feedback. Muovendo la camera - e quindi la biglia - di una distanza nota, si otterrà il fattore di conversione tra il segnale rilevato dal light-lever e l'effettivo spostamento in  $\mu m$ .

### 2.2.3 Calibrazione in forza

#### legge di Stokes

Di particolare importanza è la calibrazione in forza dei detector PSD, dal momento che questo parametro fisico gioca un ruolo chiave in molti esperimenti di singola molecola.

La calibrazione in forza del sistema è stata effettuata sfruttando la legge di Stokes che lega la forza  $\vec{f}$  esercitata su un corpo sferico alla velocità  $\vec{v}$  con

cui si sta muovendo:

$$\vec{f} = 6\pi\mu R\vec{v}, \quad (2.4)$$

dove  $R$  è il raggio del corpo e  $\mu$  è la viscosità del mezzo. La calibrazione avviene quindi fissando una biglia di dimensione nota con la trappola ottica e muovendo la cameretta a diverse velocità, opportunamente impostate. Conoscendo  $R$  ed  $\mu$  si può calcolare la forza  $\vec{f}$  alla quale viene sottoposta la biglia quando la camera è in movimento e da essa ricavare il fattore di conversione in pN dei valori di tensione registrati dal PSD.

Si riportano in figura 2.14 i grafici che mostrano la relazione tra i valori rilevati dal detector PSD del laser A nella direzione x (PSDAx) con la velocità della cameretta (Fig. 2.14(a)); in figura 2.14(b) è riportata la calibrazione tra i valori forniti dal PSD e i valori di forza noti dalla legge di Stokes.

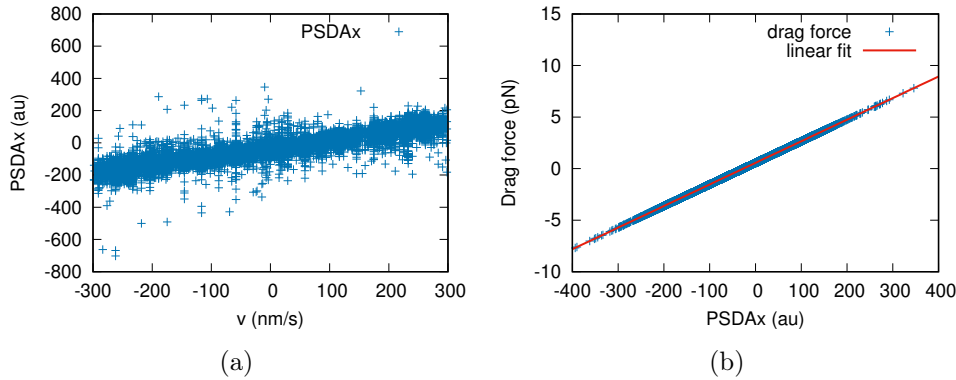


Figura 2.14: **Calibrazione di Stokes:** si riportano i grafici relativi alla calibrazione di Stokes. In a) si mostra la relazione lineare attesa tra i valori del PSD e la velocità della camera; in b) si ha la calibrazione tra i segnali del PSD e i corrispondenti valori noti di forza: la retta interpolante i dati è  $f = 0.02 \cdot PSDAx + 0.56$ . Le incertezze dei parametri di calibrazione sono dell'ordine di  $10^{-5} \%$

### Moto browniano

Un altro metodo che può essere utilizzato per la calibrazione in forza del sistema si basa sullo studio del moto browniano di una biglia intrappolata otticamente. Come già rappresentato in figura 1.1, il potenziale generato dalla trappola ottica è ben approssimato da un potenziale armonico. In

queste condizioni l'equazione del moto che descrive i movimenti della biglia è

$$\gamma \frac{dx}{dt} = -kx + \eta(t), \quad (2.5)$$

dove si è posto il termine inerziale  $m \frac{d^2x}{dt^2}$  a zero; con  $x$  si è indicata una coordinata unidimensionale che esprime la posizione della biglia rispetto al centro della trappola,  $k$  è la rigidità della trappola ottica,  $\gamma$  il coefficiente di viscosità ( $\gamma = 6\pi\mu R$ ) e  $\eta(t)$  una forza stocastica che agisce sulla biglia che rappresenta le fluttuazioni termiche.

In queste condizioni la densità spettrale di potenza della forza  $S_F$  (definibile secondo il Teorema di Wiener-Khinchin anche come la trasformata di Fourier della funzione di autocorrelazione della forza) segue una distribuzione lorentziana data da (nel caso ad esempio della forza lungo  $y$ ):

$$S_{F_y}(\nu) = \langle F_y \cdot F_y^* \rangle = \frac{2kk_B T \omega_c}{\omega_c^2 + (2\pi\nu)^2}, \quad (2.6)$$

dove  $\nu$  è la frequenza,  $F_y$  è la trasformata di Fourier della forza lungo  $y$ ,  $k_B$  è la costante di Boltzmann,  $T$  la temperatura e  $\omega_c$  è la frequenza di taglio data dal rapporto  $\omega_c = k/\gamma$ .

L'equazione 2.6 può essere usata per ottenere i parametri di calibrazione confrontando la predizione teorica con lo spettro di potenze ottenuto sperimentalmente. Tale spettro si ottiene misurando il segnale dei PSD ( $PSD_y$ ) dato da una biglia in acqua Milli-Q intrappolata otticamente con una potenza laser tale da avere una bassa frequenza di taglio, situazione verificata in tutto il range di intensità luminosa accessibili dallo strumento in uso. Suddividendo le coppie di segnale di tempo e forza in intervalli di 1 secondo, vi si applica la trasformata di Fourier e se ne calcola il modulo quadro. Mediando quindi su tutti gli intervalli, si ottiene una stima sperimentale dello spettro di potenza ( $S_{PSD_y}$ ), da fittare con una curva lorentziana:

$$S_{PSD_y}(\nu) = \langle PSD_y \cdot PSD_y^* \rangle = \frac{A}{B + (2\pi\nu)^2}, \quad (2.7)$$

con  $A$  e  $B$  parametri di fit.

Chiamando  $M_y$  il fattore di calibrazione tra il segnale  $PSD_y$  e la forza lungo

y, si ottiene il sistema

$$\begin{cases} S_{F_y}(\nu) = M_y^2 \cdot S_{PSD_y}(\nu) \\ \frac{2kk_B T \omega_c}{\omega_c^2 + (2\pi\nu)^2} = \frac{M_y^2 \cdot A}{B + (2\pi\nu)^2} \end{cases} \quad (2.8)$$

da cui si possono ricavare, a partire dai parametri di fit ottenuti, il fattore  $M_y$  e la rigidità della trappola  $k$ :

$$\begin{cases} M_y = \sqrt{2k_B T \gamma B / A} \\ k = \gamma \sqrt{B}. \end{cases} \quad (2.9)$$

### 2.2.4 Calibrazione per la posizione della biglia

Sfruttando misure di moto browniano di una biglia intrappolata con laser a bassa potenza, è possibile anche effettuare una calibrazione per ottenere gli spostamenti della biglia in nm. Una volta intrappolata la biglia, si muove uno dei due fasci laser lungo x - o y - e si mettono in relazione i valori in nm della posizione della trappola (già calibrata), forniti dal *light-lever*, e i valori del PSD. In particolare, dal momento che la biglia tende a posizionarsi sempre al centro della trappola, quando uno dei due laser si sposta di una distanza nota, la biglia varierà la sua posizione di equilibrio di una quantità pari alla metà della distanza percorsa dal fascio, producendo una variazione nei valori di intensità luminosa registrati dal PSD (Fig. 2.16(a)). Il software del sistema fornisce sia i valori di tensione differenziali rilevati dal PSD in x e y, PSDAx, PSDAy, PSDBx e PSDBy (formule 2.1, 2.2), sia i valori della loro somma, PSDAsum e PSDBsum (formula 2.3): il segnale da utilizzare nella calibrazione, cui si farà riferimento col nome  $PSDAy_{norm}$ , è il rapporto tra i due, procedura che garantisce la validità della calibrazione per diverse potenze.

Nel nostro caso si è deciso di mantenere fissa la posizione del fascio laser B e movimentare il fascio A, monitorando nel tempo la posizione e il PSD relativi a quest'ultimo. In figura 2.16(a) sono riportati gli spostamenti della trappola A lungo l'asse y (distAy in nm) e la corrispondente variazione dei valori registrati dal detector PSD ( $PSDAy_{norm}$ , in unità arbitrarie). Te-

nendo conto che la variazione dei valori di  $PSDAy_{norm}$  corrisponde ad uno spostamento della biglia in nm pari alla metà della distanza percorsa dalla trappola A ( $distA/2$ ) (Fig. 2.15), è possibile calibrare i detector in nm semplicemente realizzando un'interpolazione lineare dei due parametri in gioco, ossia  $PSDAy_{norm}$  e  $distAy/2$  (Fig. 2.16(b)). Da tale interpolazione si ottengono i parametri di calibrazione che permettono di esprimere i valori del PSD relativi al movimento della biglia in nm 2.2.

Per garantire la massima precisione nella calibrazione, bisogna effettuare tale operazione per entrambe le trappole, A e B, sia lungo x che lungo y.

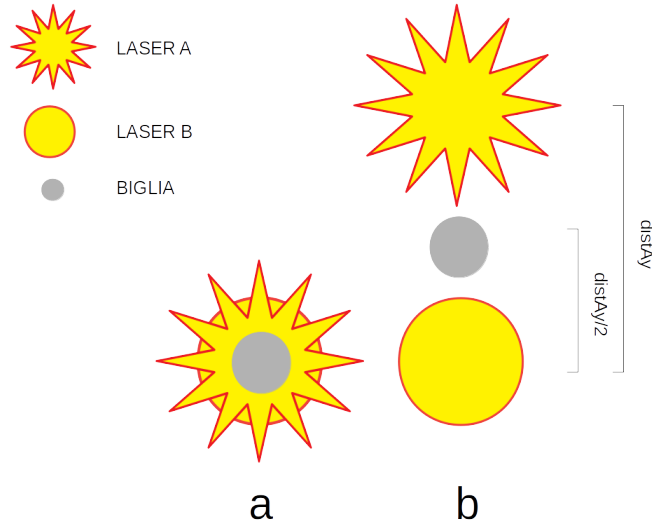


Figura 2.15: **Movimentazione della trappola A per la calibrazione della posizione della biglia:** nel disegno sono rappresentate due situazioni relative a una diversa posizione della trappola A rispetto alla trappola B e il conseguente spostamento della biglia. In **a** le trappole sono sovrapposte e la biglia si posiziona nel loro centro; in **b** la biglia si posiziona in una posizione intermedia rispetto alle due trappole: se la trappola A viene mossa lungo y di una quantità  $distAy$ , la biglia si sposterà di una quantità pari a  $distAy/2$ .

| Sensore        | $f(x) = a \cdot PSD_{norm} + b$ | 187-180 (Å)        |
|----------------|---------------------------------|--------------------|
| $PSDAx_{norm}$ | a (nm/au)                       | $-5216 \pm 2$      |
|                | b (nm)                          | $110.3 \pm 0.1$    |
| $PSDAy_{norm}$ | a (nm/au)                       | $-5826 \pm 1$      |
|                | b (nm)                          | $-246.81 \pm 0.04$ |
| $PSDBx_{norm}$ | a (nm/au)                       | $-6381 \pm 3$      |
|                | b (nm)                          | $-28.8 \pm 0.1$    |
| $PSDBy_{norm}$ | a (nm/au)                       | $-8025 \pm 2$      |
|                | b (nm)                          | $-36.22 \pm 0.08$  |

Tabella 2.2: **Parametri di calibrazione per la posizione della biglia:** parametri di calibrazione ottenuti con la calibrazione effettuata muovendo sia la trappola A sia la trappola B, in x e in y.

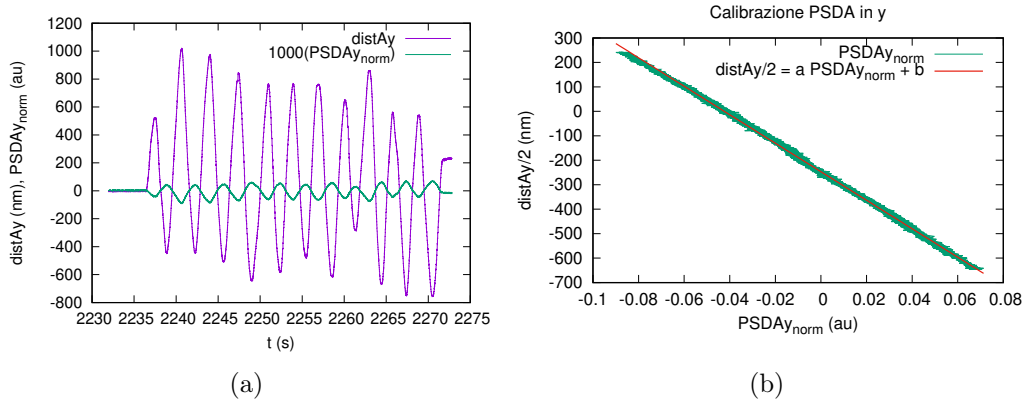


Figura 2.16: **Calibrazione della posizione della biglia:** si riporta come esempio il grafico relativo alla calibrazione della posizione y della biglia nel caso di massima potenza dei laser, muovendo la trappola A lungo y. In (a) si ha il movimento della posizione y della trappola A nel tempo assieme alla conseguente variazione dei valori del PSD, in (b) la relazione tra i due valori: dal fit della retta si ricavano i parametri di calibrazione  $a$  e  $b$  riportati in tabella 2.2.



## Capitolo 3

# Esperimenti di singola molecola

Come accennato nei capitoli precedenti, le Optical Tweezers sono un sistema ideale per effettuare studi di singola molecola. La biomolecola in studio - ad esempio una sequenza di DNA, o di RNA, o una proteina - è fissata tra due biglie, variando la distanza tra le quali si può esercitare una forza sul sistema in maniera controllata.

Tali esperimenti permettono di indagare le proprietà elastiche delle biomolecole al fine di ottenere informazioni utili su parametri chiave nella determinazione della funzione biologica della molecola, come ad esempio l'impacchettamento del DNA nel nucleo di una cellula, la formazione dei filamenti di actina nel citoplasma o la regolazione genica; le proprietà elastiche determinano inoltre la struttura delle molecole e di conseguenza anche la loro funzione.

### 3.1 Biomolecole

Per biomolecole si intendono quei composti organici che permettono il corretto svolgimento di importanti funzioni nella vita di una cellula e più in generale di un organismo: ad esempio, gli acidi nucleici permettono di codificare, copiare e trasmettere le informazioni genetiche, le proteine svolgono un ruolo fondamentale nella catalisi di reazioni metaboliche, nel trasporto di molecole e nella duplicazione del DNA e i carboidrati sono responsabi-



li dell'immagazzinamento e trasporto di energia. Spesso le biomolecole si associano e formano macromolecole, svolgendo svariate funzioni biologiche.

### 3.1.1 Acidi nucleici

Gli acidi nucleici sono delle macromolecole polimeriche costituite da nucleotidi, composti organici formati da un gruppo fosfato, uno zucchero pentoso e una base azotata. Lo zucchero è Ribosio nel caso dell'acido ribonucleico (RNA), mentre è Deossiribosio nel caso dell'acido deossiribonucleico (DNA) (Fig. 3.1 a). Vi sono cinque basi azotate che distinguono i vari nucleotidi: adenina (A), citosina (C) e guanina (G) che si trovano in entrambi gli acidi nucleici, mentre la timina (T) si trova solamente nel (DNA) e l'uracile (U) nell'RNA (Fig. 3.1 b). A e G sono purine, mentre C, T e U sono pirimidine. In entrambe le catene polimeriche i nucleotidi sono tra loro collegati tramite legami fosfodiesterici, che collegano un carbonio in posizione 5' di uno zucchero pentoso al carbonio in posizione 3' del nucleotide successivo (Fig. 3.1 c). Il senso di un acido nucleico è quindi definito dalla direzione dei legami fosfodiesterici tra due nucleotidi seguenti (5'-3' o 3'-5'); per convenzione la sequenza di nucleotidi in un acido nucleico viene data nella direzione 5'-3'.

**DNA** Il DNA è formato da due catene di nucleotidi legate tra loro tramite legami idrogeno che intercorrono tra le basi azotate delle due catene; tali legami seguono precise regole e avvengono solamente tra A e T con un doppio legame idrogeno ( $A=T$ ) e tra C e G con un legame triplo ( $C\equiv G$ ) (Fig. 3.2(a)). Ci si riferisce ad ognuna di queste coppie di nucleotidi come *base pair* (bp). Le due catene nucleotidiche che formano il DNA devono essere quindi complementari e quindi, nota la sequenza nucleotidica di una catena, è possibile conoscere anche quella dell'altra, grazie a tale corrispondenza univoca di legami tra purine e pirimidine.

Le due catene nucleotidiche formano varie strutture a doppia elica che si possono riscontrare in natura: la più comune è la struttura B (B-DNA), una doppia elica regolare destrorsa con diametro costante di 2 nm e passo di 3,4 nm (10 bps ogni giro, distanti tra loro 0,34 nm). In figura 3.2(b) sono

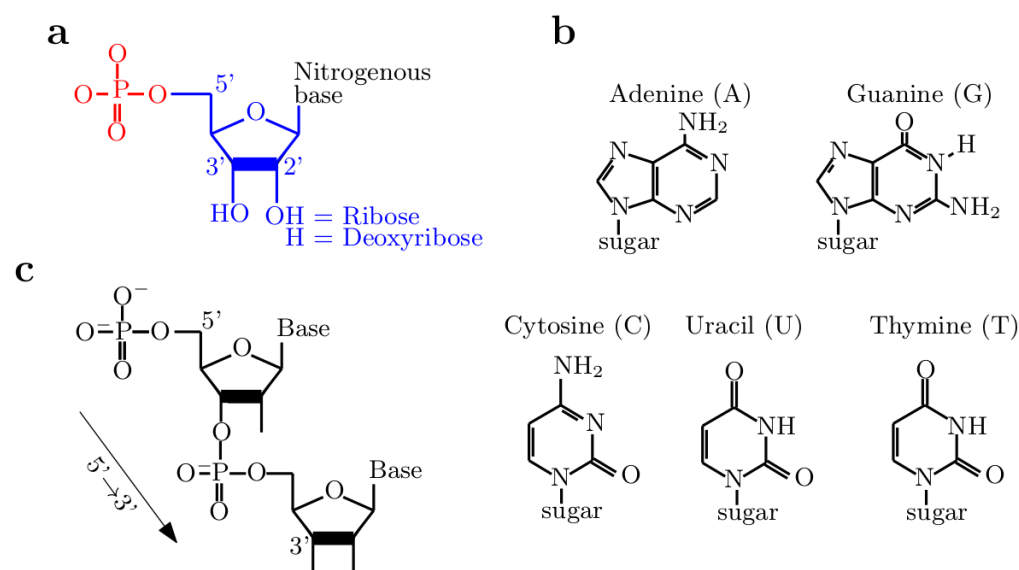


Figura 3.1: **Nucleotidi:** **a** struttura chimica di un nucleotide, formata da un gruppo fosfato (in rosso), lo zucchero pentoso (blu) e la base azotata (in nero): lo zucchero è Ribosio o Deossiribosio a seconda degli atomi legati al carbonio in posizione 2'; **b** struttura chimica delle basi azotate: adenina (A) citosina (C), timina (T), guanina (G) e uracile (U); **c** legame fosfodiesterico tra due nucleotidi successivi.

riportate anche le strutture A (doppia elica destrorsa 11 bsp a giro distanti 0,21 nm) e Z (doppia elica sinistrorsa, con 12 bsp a giro distanti 0,38 nm).

**RNA** L'RNA è formato da una singola catena nucleotidica. Vi sono tre tipi di RNA: l'RNA messaggero (mRNA), l'RNA ribosomiale (rRNA) e l'RNA di trasporto (tRNA), che differiscono per struttura e per la funzione svolta. L'mRNA trasporta le informazioni genetiche dal nucleo della cellula al citoplasma, dove avviene la sintesi delle proteine; l'rRNA è componente essenziale dei ribosomi, quelle macchine molecolari che leggono l'mRNA e sintetizzano le proteine; il tRNA fornisce al ribosoma gli amminoacidi necessari per la sintesi della proteina.

Tra i nucleotidi di una catena di RNA possono intercorrere dei legami idrogeno, con la formazione di varie strutture secondarie, come rappresentato in figura 3.3.

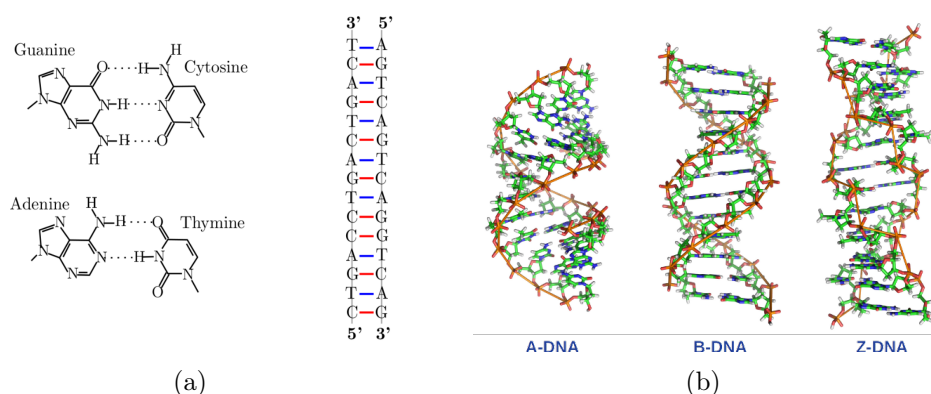


Figura 3.2: **Struttura del DNA:** in (a) si riportano i legami idrogeno che legano i nucleotidi di due catene nucleotidiche; in (b) sono rappresentate tre delle molte configurazioni di doppia elica che può assumere il DNA.

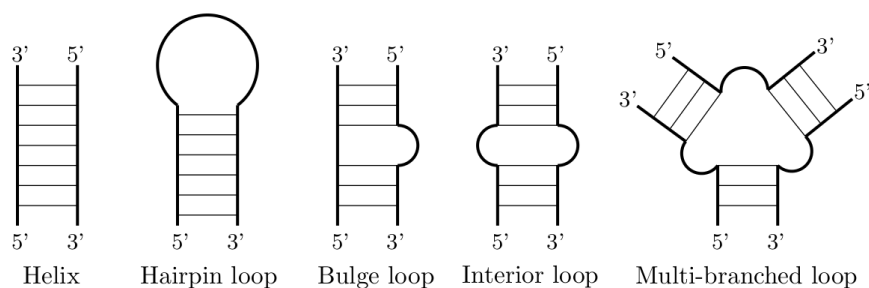


Figura 3.3: **Strutture secondarie dell'RNA:** l'interazione tra i nucleotidi di un RNA può portare alla formazione locale di doppie eliche, *hairpin loop*, *bulge loop*, *interior loop* e *multi-branched loops*.

### 3.1.2 Proteine

Le proteine svolgono svariati compiti all'interno di un organismo biologico: sono importanti costituenti strutturali di membrane e tessuti, catalizzano reazioni e regolano diversi processi che avvengono in un organismo vivente, trasportano materiale dall'interno all'esterno delle cellule e sono responsabili del movimento delle cellule stesse.

Le proteine sono formate da sequenze di amminoacidi, costituiti da un atomo di carbonio ( $C_\alpha$ ) a cui sono legati un gruppo amminico, un gruppo carbossilico e una catena laterale detta *residuo* (R), diverso da amminoacido ad amminoacido (Fig. 3.4 a). In natura vi sono 20 amminoacidi diversi, ognuno

caratterizzato da un preciso residuo. Gli amminoacidi si legano tra loro con legami peptidici, legami covalenti che intercorrono tra il gruppo amminico di un amminoacido e il gruppo carbossilico del successivo (Fig. 3.4b).

La sequenza di amminoacidi costituisce la struttura primaria di una proteina. La struttura secondaria è invece data dalle interazioni locali che possono avvenire tra amminoacidi distanti tra loro: alcune di queste sono le strutture  $\alpha$  ( $\alpha$  - *helix*), spirali destrorse formate per un'interazione tra il gruppo carbossilico di un amminoacido e quello amminico di un altro, non primo vicino; vi sono poi i foglietti  $\beta$  ( $\beta$  - *sheets*), con la formazione di più legami idrogeno consecuzionali, fortemente direzionali. La struttura terziaria è invece data dalla struttura tridimensionale determinata dalle interazioni di amminoacidi dell'intera catena peptidica (Fig. 3.4c).

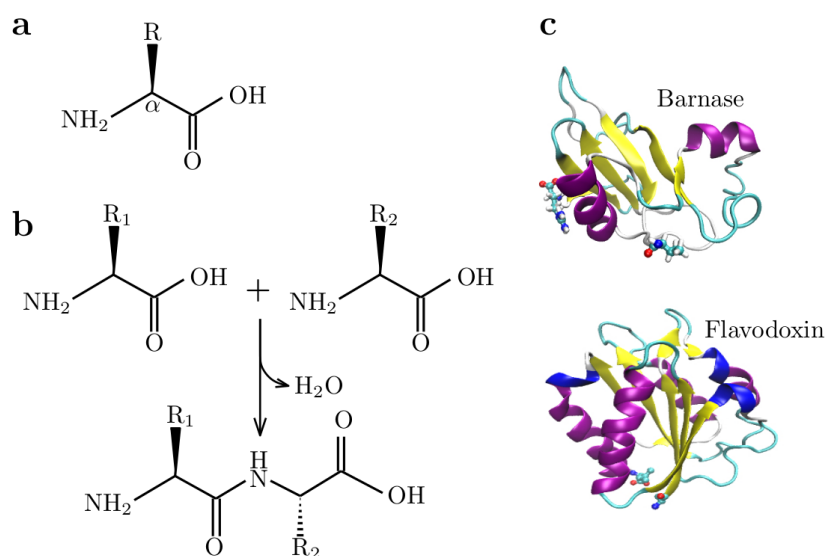


Figura 3.4: **Amminoacidi e proteine:** **a** struttura chimica di un amminoacido; **b** legame peptidico tra due amminoacidi: il legame covalente tra il gruppo carbossilico e il gruppo amminico determina il rilascio di una molecola d'acqua; **c** rappresentazione tridimensionale di due proteine, Barnase e Flavodoxina: le  $\alpha$  - *helix* sono colorate in rosa, i  $\beta$  - *sheets* in giallo e le strutture casuali in ciano.

### 3.1.3 Il sistema biologico CD4L20

I linfociti T *helper* sono delle cellule molto importanti per la regolazione del sistema immunitario degli esseri umani e in particolare nell'immunità adattiva. In particolare, le  $CD4^+$  T *helper cells* sono dei linfociti T che presentano sulla membrana la glicoproteina CD4, che gioca un ruolo chiave nel riconoscimento e nella successiva distruzione di infezioni: esse inviano segnali ad altre molecole, come la CD8, la cui funzione è quella di uccidere l'ospite infetto. Quindi una errata o diminuita espressione di molecole CD4 compromette il corretto funzionamento del sistema immunitario umano.

La caratteristica che rende le proteine CD4 molto interessanti è il ruolo chiave che svolgono nel riconoscimento di infezioni da virus dell'immunodeficienza umana (HIV): nell'attaccare l'organismo, inizialmente le proteine presenti sull'involucro esterno del virus HIV si legano con le proteine CD4 presenti sulla membrana della cellula ospite, iniziando il processo che porterà alla successiva invasione della cellula stessa (Fig. 3.5) [21].

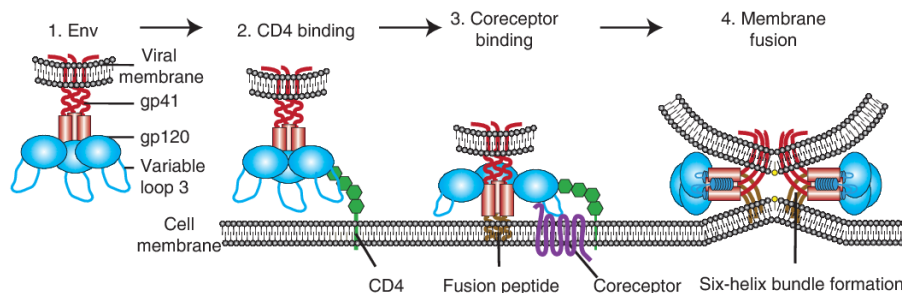


Figura 3.5: **Entrata del virus HIV nella cellula ospite [21]**: la proteina di membrana del virus HIV (Env) si lega alla CD4 della cellula ospite; dopo essersi legato anche a un corecettore vicino, la membrana della cellula viene aperta e il virus entra nella cellula ospite.

L'azione del virus HIV porta a un graduale malfunzionamento oltre ad un significativo calo del numero di proteine CD4 espresse nell'organismo: quest'ultimo è proprio il primo segnale ricercato dai medici per diagnosticare il contagio da HIV.

In questo lavoro di tesi si studierà il comportamento dell'hairpin mRNA coinvolto nel processo di espressione di proteine CD4, detto hairpin CD4. La

sequenza nucleotidica originaria, con tetraloop, è riportata in figura 3.6(a) [23]. Gli hairpin da noi utilizzati sono una mutazione di tale sequenza, e presentano un loop di 20 nucleotidi (Fig. 3.6(b)). Si farà quindi riferimento a tali molecole con la sigla CD4L20.

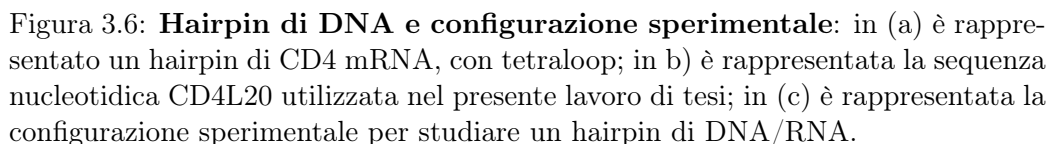
Gli hairpin CD4L20 sono formati da una parte a doppia elica che presenta 20 coppie di nucleotidi, detta *stem* e un *loop* di 20: in totale la catena presenta quindi in tutto 60 nucleotidi.

## 3.2 Manipolazione di singole molecole

### 3.2.1 Funzionalizzazione delle biglie

Alle estremità degli hairpin CD4L20 studiati sono fissate delle catene nucleotidiche di DNA a doppia elica (29 coppie di nucleotidi), che costituiscono le cosiddette *maniglie* del sistema (*handles* in figura 3.6(c)), ad ognuna delle quali si fissa una biglia tramite legami biochimici di Streptavidina-Biotina e Digoxigenina-Antidigoxigenina. Tali legami si riescono a creare tramite un'opportuna funzionalizzazione delle maniglie e delle biglie e una precisa procedura sperimentale.

Per effettuare l'esperimento si utilizzano due biglie di polistirene con indice di rifrazione pari a 1.51, di dimensione diversa: esse presentano un diametro di circa  $2\text{ }\mu\text{m}$  (PC-S-2.0 Coated Polystyrene Particles-Streptavidine-polystyrene 2.0-2.9  $\mu\text{m}$ , LIFELINELAB Srl) e di circa  $3\text{ }\mu\text{m}$  (PC-PG-3.0 Coated Polystyrene Particles-Protein G-polystyrene 3.0-3.5  $\mu\text{m}$ , LIFELINELAB Srl). Come indicato nelle specifiche riportate, le biglie più piccole presentano già all'acquisto un ricoprimento di Streptavidina e durante l'esperimento si attaccheranno a una maniglia del sistema biologico, la cui estremità viene modificata con Biotina, così da formare un forte legame Biotina-Streptavidina. Le biglie più grandi dovranno invece essere opportune funzionalizzate con Antidigoxigenina, così che si formi un legame gene-antigene con l'altra maniglia del sistema, modificata con Digoxigenina. Questi specifici legami biochimici avvengono solamente tra le biglie e le estremità delle maniglie, senza quindi interagire direttamente con la molecola che si intende studiare, così da non



Le biglie AD vengono inizialmente centrifugate e sospese in DMP *cosslinker*, un composto chimico che favorisce il legame tra catene polimeriche. Si lasciano quindi le biglie in incubazione con Antidigoxigenina per 60 minuti, così che si crei il legame con la proteina G presente sulla loro superficie. Si procede quindi con la centrifuga e sospensione in PBS.

### 3.2.2 Procedura sperimentale

Gli esperimenti di singola molecola vengono realizzati dentro ad una camera microfluidica che quella descritta nella sezione 2.1.5. L'esperimento avverrà nella camera microfluidica, in cui si fa fluire la soluzione tampone (*buffer*) che, nel caso di CD4L20, è formata da 1M di NaCl, 10mM di TRIZMAbase (Sigma Aldrich T1503) e 0.01% di Sodium azide 0.02M ( $\text{NaN}_3$  Sigma Aldrich 52002).

La procedura sperimentale è la seguente:

1. innanzitutto si procede a fissare le catene di RNA alle biglie grandi tramite un'incubazione delle molecole con le biglie, in concentrazioni tali che ad ogni biglia si fissi una sola molecola. L'incubazione avviene per 30 minuti a temperatura ambiente. Durante questo processo si crea il legame tra la Digoxigenina delle maniglie del RNA e l'Antidigoxigenina delle biglie (AD). Contemporaneamente, in un contenitore separato, una certa quantità di biglie piccole (SA) viene diluita nel buffer, in rapporto 1:1000, così da creare una soluzione pronta da utilizzare durante l'esperimento.

Una volta che le biglie SA e AD sono pronte, si può procedere al loro inserimento nella camera microfluidica, separatamente in due diversi canali.

2. Come rappresentato in figura 3.7, le biglie SA vengono inserite nel canale più basso: esse fluiscono nel canale centrale tramite il tubo dispensatore, all'uscita del quale ne viene intrappolata una con la trappola ottica (Fig. 3.7(a)). Muovendo quindi la camera si porta la biglia sulla punta della micropipetta, dove viene fissata per suzione (Fig. 3.7(b)).
3. Si procede quindi con l'inserimento delle biglie grandi, a cui sono fissate le biomolecole, tramite il canale superiore: anche queste fluiscono nel tubo dispensatore, una viene intrappolata otticamente e portata sopra la pipetta (Fig. 3.7(c)).
4. A questo punto la biglia SA si trova sulla punta della micropipetta e la biglia AD, con la molecola, è intrappolata nella trappola ottica. Muo-



vendo la camera si procede ad avvicinare delicatamente le due biglie, fino a fare contatto, permettendo al legame Streptavidina e Biotina di formarsi (Fig. 3.7(d)).

La molecola si trova quindi fissata tra le due biglie e lo studio del sistema biologico può iniziare.

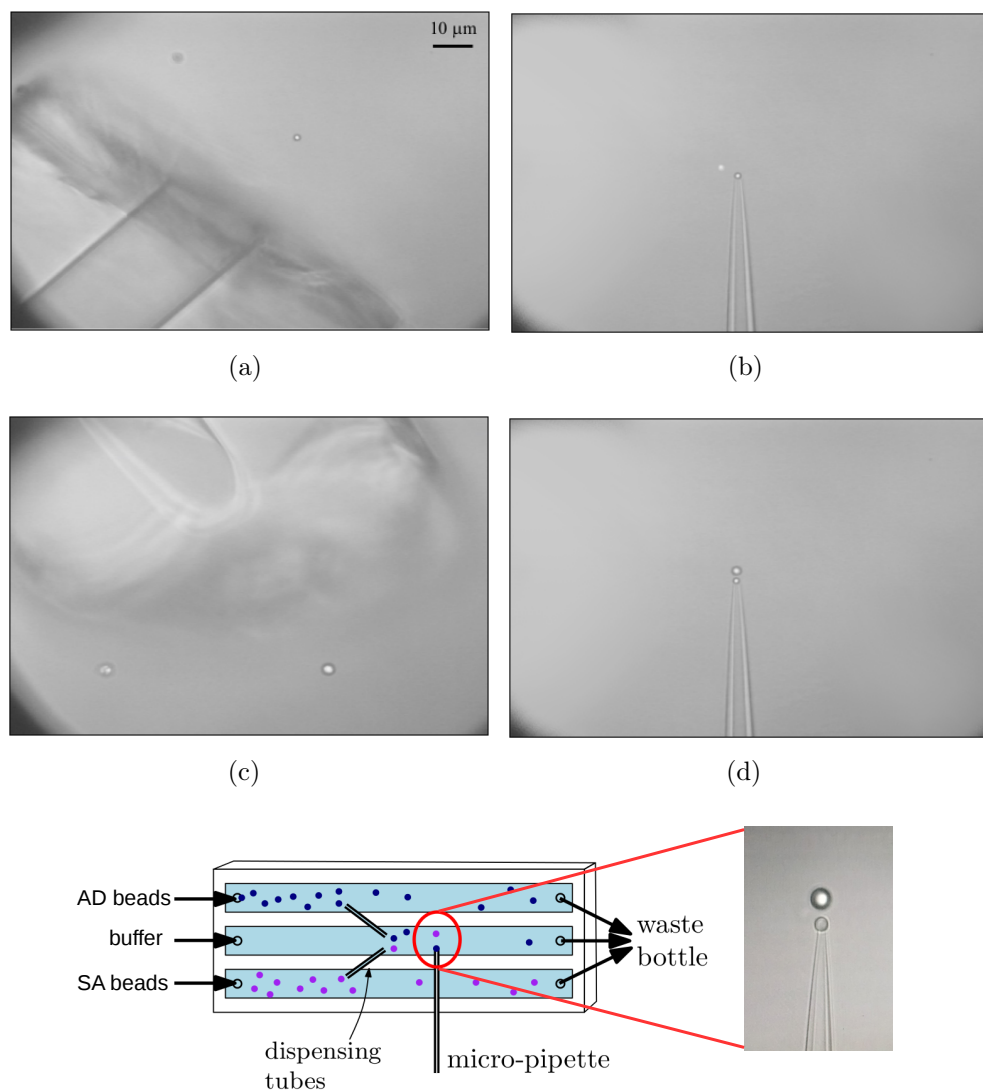


Figura 3.7: **Procedura sperimentale:** schema del sistema microfluidico durante la preparazione dell'esperimento e quattro step di intrappolamento che portano ad attaccare la molecola alla biglia SA: (a) le biglie SA vengono inserite nel canale inferiore ed entrano nel canale centrale tramite il tubo dispensatore; (b) una di queste viene intrappolata otticamente e portata sulla punta della micropipetta dove viene fissata per suzione; (c) vengono quindi inserite le biglie AD nel canale superiore; (d) una di queste biglie viene intrappolata otticamente e avvicinata alla biglia SA, così che avvenga il contatto tra Streptavidina-Biotina. La molecola è quindi fissata tra le due biglie e può essere studiata.

### 3.3 Modellizzazione delle catene polimeriche

#### 3.3.1 Catene ideali

In generale, le catene polimeriche si possono modellizzare come delle catene formate da delle unità fondamentali, i monomeri. A seconda delle varie interazioni presenti tra i monomeri la catena avrà diversi gradi di libertà nei suoi movimenti, che determineranno anche la configurazione della catena stessa.

Si consideri una catena formata da  $n + 1$  monomeri  $A_i$  ( $0 \leq i \leq n$ ), con vettori di legame  $\vec{r}_i$  di uguale modulo  $l$ , che collegano il monomero  $A_{i-1}$  al monomero  $A_i$  (Fig. 3.8(a)).

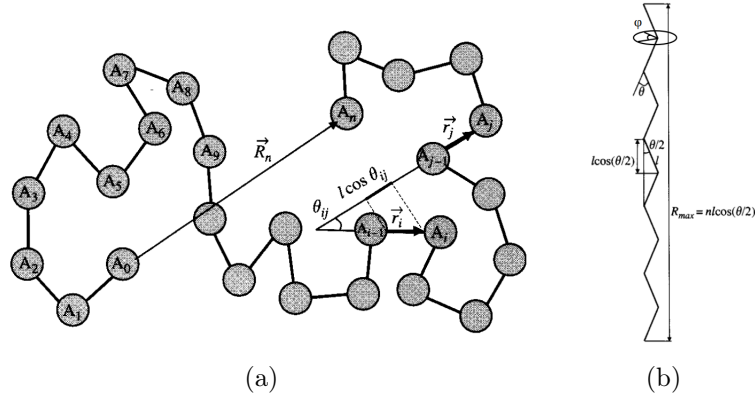


Figura 3.8: **Modello di un polimero:** a) i monomeri  $A_i$  presentano tra loro legami modellizzati da segmenti  $l$ , con direzione data dai vettori  $\vec{r}_{i,j}$ , che formano tra loro angoli  $\theta_{i,j}$ . Il vettore  $\vec{R}_n$  è la *end-to-end distance* [27]. b) configurazione con tutti i legami sullo stesso piano.

Nel caso di una catena ideale non sono presenti interazioni tra i monomeri, che sono liberi di assumere tutte le posizioni nello spazio al variare degli angoli  $\theta$  e  $\phi$  riportati in figura 3.8(b).

La lunghezza della catena, intesa come la somma di tutti i vettori di legame è detta *end-to-end distance*:

$$\langle \vec{R}_n \rangle = \sum_{i=1}^n \vec{r}_i. \quad (3.1)$$

Il massimo valore della end-to-end distance che si può ottenere tra tutte le possibili configurazioni di una molecola è della lunghezza al contorno (*contour lenght*). Ad esempio, nel caso di una catena polimerica con monomeri interagenti, con i legami disposti sullo stesso piano ( $\phi_{i+1} - \phi_i = 0$ ) e che formano tra loro angoli  $\theta$  costanti, si avrà una lunghezza di contorno (Fig. 3.8(b)):

$$R = nl \cos \frac{\theta}{2}. \quad (3.2)$$

Nel caso di una catena con  $\theta$  nullo, la lunghezza sarà data da  $R_{max} = nl$ . Tornando al caso di una catena ideale, in cui  $\theta$  e  $\phi$  assumono valori casuali, la media su tutte le configurazioni (e quindi su tutti gli angoli) possibili porterà a una lunghezza di contorno nulla

$$\langle \vec{R}_n \rangle = 0. \quad (3.3)$$

Una grandezza che può essere quindi utilizzata al fine dello studio della catena, la cui media sia non nulla, è la distanza di contorno quadratica media:

$$\langle \vec{R}_n^2 \rangle = \langle \vec{R}_n \cdot \vec{R}_n \rangle = \left\langle \left( \sum_{i=1}^n \vec{r}_i \right) \cdot \left( \sum_{j=1}^n \vec{r}_j \right) \right\rangle = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \langle \vec{r}_i \cdot \vec{r}_j \rangle. \quad (3.4)$$

Se tutti i legami hanno la stessa lunghezza  $l$ , il prodotto scalare tra i due vettori si può scrivere in termini dell'angolo  $\theta_{ij}$  come

$$\vec{r}_i \cdot \vec{r}_j = l^2 \cos \theta_{ij}. \quad (3.5)$$

Combinando la 3.4 e 3.5 si ottiene quindi

$$\langle \vec{R}_n^2 \rangle = l^2 \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \langle \cos \theta_{ij} \rangle. \quad (3.6)$$

Uno dei modelli di catene polimeriche ideali più semplici è il modello di *freely jointed chain* (FJC), in cui  $\langle \cos \theta_{ij} \rangle = \delta_{ij}$  e  $\langle \vec{R}_n^2 \rangle = nl^2$ .

Nel caso reale invece le interazioni tra monomeri sono presenti, ma si possono

comunque trascurare interazioni tra monomeri molto distanti tra loro:

$$\lim_{|i-j| \rightarrow \infty} \langle \cos \theta_{ij} \rangle = 0. \quad (3.7)$$

Nel caso ad esempio della modellizzazione del DNA, vengono usati due modelli di catena ideale: il *freely rotating chain model* e il *worm like chain model*.

**Freely rotating chain model** Tale modello descrive catene polimeriche che presentano una certa rigidità, assumendo  $\theta$  costante; l'angolo  $\phi$  è invece libero di variare tra  $-\pi$  e  $\pi$ . Essendo  $\theta$  costante, si ha che

$$\begin{aligned} \langle \cos \theta_{i,i+1} \rangle &= \cos \theta \\ \langle \cos \theta_{i,i+2} \rangle &= (\cos \theta)^2 \\ &\vdots \\ \langle \cos \theta_{i,j} \rangle &= (\cos \theta)^{|i-j|}. \end{aligned} \quad (3.8)$$

La correlazione presente tra vettori di legame  $\vec{r}_i$  ed  $\vec{r}_j$  è quindi pari a

$$\langle \vec{r}_i \cdot \vec{r}_j \rangle = (\cos \theta)^{|i-j|} = e^{|i-j| \ln \cos \theta} = e^{-\frac{|i-j|}{S_p}} = e^{-\frac{|i-j|l}{S_p l}} = e^{-\frac{|i-j|l}{P}} \quad (3.9)$$

dove  $S_p$  è chiamato *numero di persistenza* ed è pari a

$$S_p = -\frac{1}{n \ln \cos \theta} \quad (3.10)$$

e  $P = S_p l$  è detta *lunghezza di persistenza*, che non è altro che una lunghezza di decadimento della correlazione presente tra due monomeri in posizioni  $i$ -esima e  $j$ -esima.

**Worm like chain model** Il modello WLC è un caso del freely rotating chain model in cui  $\theta$  ha un valore molto piccolo. È un modello particolarmente adatto per la descrizione di polimeri rigidi, come il DNA.

Per  $\theta \ll 1$  si ha che  $\cos \theta \cong 1 - \frac{\theta^2}{2}$  e  $\ln(1 - \frac{\theta^2}{2}) \cong -\frac{\theta^2}{2}$ ; in questo modello

quindi si ha che

$$S_p = -\frac{1}{\ln(\cos\theta)} \cong \frac{2}{\theta^2}. \quad (3.11)$$

La lunghezza di persistenza risulta quindi pari a

$$P = S_p l = l \frac{2}{\theta^2}. \quad (3.12)$$

### 3.3.2 Elasticità di un polimero

Una catena polimerica come il DNA può essere pensata come una corda sulla quale è possibile effettuare tre tipi di deformazione, che si possono descrivere a partire da un piccolo segmento  $ds$  posizionato a una distanza  $s$  da una estremità della corda (Fig. 3.9):

- **stiramento**,  $u(s)$ , che descrive la variazione di lunghezza della corda:  $u = \Delta(ds)/ds$ ;
- **piegamento**,  $\beta(s)$ , che misura come varia il vettore unitario tangente ( $\hat{t}$ ) alla corda nel punto  $s$  durante la deformazione:  $\beta = d\hat{t}/ds$ ;
- **twist**,  $\omega(s)$ , descrive la rotazione attorno all'asse della corda:  $\omega = \Delta\phi/ds$ .

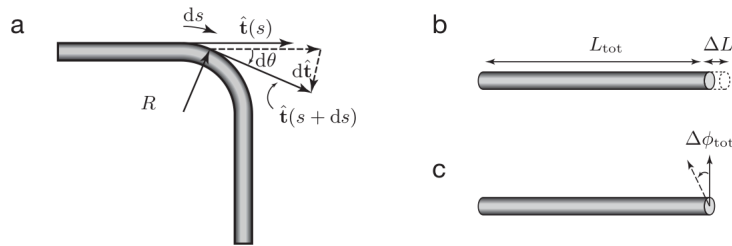


Figura 3.9: **Rappresentazione delle possibili deformazioni di una corda [28]**: a) piegamento, b) stiramento, c) twist.

Il costo energetico per compiere tali trasformazioni è, in approssimazione elastica,

$$dG(s) = \frac{1}{2} [A(\beta(s))^2 + B(u(s))^2 + C(\omega(s))^2 + 2Du(s)\omega(s)] ds, \quad (3.13)$$

dove  $A, B, C$  e  $D$  sono parametri fenomenologici.

Durante gli esperimenti di pulling del DNA, in cui la molecola viene tirata lungo una determinata direzione, l'energia del sistema conterrà due termini principali dovuti allo stiramento e al piegamento del sistema [26]: il contributo energetico dovuto alla deformazione di twist si considera trascurabile.

Il contributo di piegamento è proporzionale all'inverso del quadrato del raggio di curvatura  $R$ :

$$e_b(s) = \frac{A}{2} \left| \frac{d\vec{t}(s)}{ds} \right|^2 = \frac{A}{2R^2}. \quad (3.14)$$

Il secondo termine è dato dalla deformazione dovuta alla proiezione della forza applicata  $F$  a un'estremità della catena lungo la direzione di stiramento. L'energia totale sarà quindi

$$E_{WLC} = \int_0^{L_0} \left( \frac{A}{2} \left| \frac{d\vec{t}(s)}{ds} \right|^2 - F \cos \theta(s) \right) ds, \quad (3.15)$$

dove  $\theta(s)$  è l'angolo tra il vettore tangente  $\vec{t}(s)$  e la direzione di azione della forza e  $L_0$  è la lunghezza di contorno del sistema.

La funzione di partizione del sistema sarà data da

$$Z(L_0, F, \vec{t}_0, \vec{t}_1) = \int D(\vec{t}) e^{-\beta E_{WLC}}, \quad (3.16)$$

dove  $\beta = 1/k_B T$  e  $D(\vec{t})$  è la variabile su cui effettuare l'integrazione, nello spazio dei possibili cammini sulla superficie di una sfera unitaria partendo da un punto  $\vec{t}(s=0) = \vec{t}_0$  fino ad arrivare al punto  $\vec{t}(s=L_0) = \vec{t}_1$ . Tale espressione descrive una particella fittizia di carica unitaria che si muove su una sfera sotto l'azione di un campo elettrico,  $F$ , con la variabile temporale  $t = Im(s)$  [26].

Si dimostra ([26]) che la funzione di partizione può essere quindi riscritta come

$$Z(L_0, F, \vec{t}_0, \vec{t}_1) = \left\langle \vec{t}_1 \left| e^{-\frac{L_0}{L_p} \hat{H}_{WLC}} \right| \vec{t}_0 \right\rangle, \quad (3.17)$$

dove  $L_p$  è la lunghezza di persistenza e

$$\hat{H}_{WLC} = -\frac{1}{2\sin\theta} \frac{\partial}{\partial\theta} \sin\theta \frac{\partial}{\partial\theta} - \beta L_p F \cos\theta. \quad (3.18)$$

Nel caso di una catena polimerica tirata si ha che per il primo principio della termodinamica  $dU = TdS + Fdz$ , dove  $U$  è l'energia del sistema,  $T$  è la temperatura,  $S$  l'entropia,  $F$  la forza che agisce sul sistema e  $z$  l'allungamento. Definendo l'energia libera di Gibbs come  $G = U + PV - TS$ , si ha che  $dG = -z dF - S dT$  [30]. A partire dalla funzione di partizione  $Z$  di un sistema, si può quindi calcolare l'energia libera di Gibbs come  $G = -k_B T \ln Z$ . Derivando quindi  $G$  rispetto alla forza si otterrà l'allungamento del sistema:

$$R = -\frac{\partial G}{\partial F}. \quad (3.19)$$

Una volta trovati quindi gli autovalori ed autovettori di un sistema WLC e applicando l'approssimazione per cui  $L_0 \gg L_p$ , si ottiene che

$$\frac{\langle z \rangle}{L_0} = -\frac{k_B T}{L_0} \frac{\partial \ln Z}{\partial F} = \langle \Psi_0 | \cos\theta | \Psi_0 \rangle, \quad (3.20)$$

dove  $\Psi_0$  è lo stato fonamentale del sistema.

Risolvendo l'equazione agli autovalori

$$\hat{H}_{WLC} \Psi_0(\theta) = \epsilon_0 \Psi_0 \quad (3.21)$$

si può ottenere una relazione che ben descrive il legame tra la forza esercitata sul sistema  $F$  e l'allungamento  $z$  [26, 25]:

$$F = \frac{K_B T}{L_p} \left[ \frac{1}{4(1 - z/L_0)^2} - \frac{1}{4} + \frac{z}{L_0} + \sum_{i=2}^{i \leq 7} \alpha_i \left( \frac{z}{L_0} \right)^i \right], \quad (3.22)$$

dove i coefficienti  $\alpha_i$  possono essere considerati nulli [25] o pari a  $\alpha_2 = -0.5164228$ ,  $\alpha_3 = -2.737418$ ,  $\alpha_4 = 16.07497$ ,  $\alpha_5 = -38.87607$ ,  $\alpha_6 = 39.49944$  e  $\alpha_7 = -14.17718$ .



### 3.4 Esperimenti di pulling

Come espresso chiaramente dall'equazione 3.22, esiste una relazione matematica tra la forza applicata ad una molecola, il suo conseguente allungamento e i parametri elastici del sistema biologico. Questi ultimi possono pertanto essere determinati osservando il comportamento della molecola sotto l'azione di forze esterne, come nel caso in cui la catena polimerica viene tirata per le estremità.

Come rappresentato in figura 3.6(c), l'hairpin di CD4L20 è tenuto per le estremità tra le due biglie, le quali possono essere allontanate o avvicinate tra loro, applicando una forza sul sistema molecolare. Esperimenti di questo tipo vengono definiti di *pulling* e permettono di monitorare la reazione della biomolecola al variare della forza applicata. Nello specifico, aumentando la forza e quindi l'allungamento dell'hairpin si promuove la rottura delle basi che compongono la catena nucleotidica, fino ad arrivare alla completa apertura dell'hairpin, che si troverà quindi nello stato *aperto* (*unfolded state*, U). Quando le biglie vengono invece avvicinate tra loro, a una certa forza il sistema torna al suo stato nativo, con una parte ripiegata a doppia elica (*folded state*, F). Le transizioni tra gli stati F e U si rivelano come un improvviso salto nella forza, che indica il cambiamento di stato, dall'hairpin chiuso ad aperto, e viceversa (Fig. 3.10(a)). Tale salto nella forza rilevata dalle Optical Tweezers è la conseguenza dello spostamento della biglia AD verso il centro della trappola nel caso di apertura dell'hairpin e lontano da esso nel caso invece di ripiegamento della catena nucleotidica.

Sono state effettuati ripetuti cicli di pulling su varie molecole, avvicinando e allontanando le biglie tra loro attraverso spostamenti della trappola ottica. La biglia AD, intrappolata otticamente, risentirà sia della forza della trappola ottica sia della forza di richiamo del sistema biologico a cui è legata, esercitata nella direzione opposta: a seconda quindi dello spostamento della biglia rispetto al centro della trappola, sarà possibile dedurre la forza esercitata sul sistema (Fig. 3.10(a)).

Sono state effettuate misure di pulling sulle molecole muovendo la trappola a diverse velocità (50 nm/s, 100 nm/s, 150 nm/s, 200 nm/s e 300 nm/s)

al fine di studiare la risposta elastica della molecola in diverse situazioni sperimentali.

### 3.4.1 Modello del sistema molecolare

Come rappresentato in figura 3.10(a), gli esperimenti di pulling permettono di monitorare il valore della forza applicata al sistema biologico in funzione della distanza  $\lambda$ , ossia la distanza tra il centro della trappola ottica e la biglia SA fissata sulla punta della micropipetta. Tale parametro  $\lambda$  tiene conto della posizione della biglia intrappolata rispetto al centro della trappola, dell'estensione molecolare delle maniglie e della proiezione dell' hairpin lungo la direzione della forza. Si può quindi scrivere che

$$\lambda = x_h(f) + x_b(f) + x_{RNA}(f), \quad (3.23)$$

dove  $x_h(f)$  è l'estensione delle maniglie quando viene applicata una forza  $f$ ,  $x_b(f)$  è la posizione della biglia rispetto al centro della trappola ottica e  $x_{RNA}$  è l'estensione dell' hairpin. In particolare,  $x_{RNA}$  dipende dallo stato in cui si trova: se l' hairpin è nello stato ripiegato  $x_{RNA}$  è pari alla proiezione del diametro della doppia elica, nella direzione di applicazione della forza ( $x_d$ ); se invece l' hairpin è aperto,  $x_{RNA}$  è data dalla distanza tra i capi della singola catena di RNA (ssRNA) all'equilibrio, a una certa forza ( $x_{ssRNA}(f)$ ).

Per variazioni di  $\lambda$ ,  $\Delta\lambda$ , vi sarà una variazione della forza che agisce su sistema,  $\Delta f$ , il cui rapporto fornisce la rigidità efficace del sistema:

$$\frac{\Delta\lambda}{\Delta f} = \frac{1}{k_{eff}} = \frac{1}{k_h} + \frac{1}{k_b} + \frac{1}{k_{RNA}}, \quad (3.24)$$

dove  $k_h$ ,  $k_b$  e  $k_{RNA}$  corrispondono alle costanti elastiche delle rispettive parti del sistema: le maniglie, la trappola ottica e la catena nucleotidica. In particolare, la  $k_{RNA}$  cambierà a seconda che l' hairpin sia aperto o chiuso. La rigidità effettiva,  $k_{eff} = \Delta f / \Delta\lambda$ , è pari alla pendenza della curva sperimentale (Fig. 3.10(b)).

Come si nota dal grafico 3.10(b), il salto di forza  $\Delta f_{F \rightarrow U}$  che si osserva al passaggio dal sistema chiuso al sistema aperto avviene in corrispondenza di

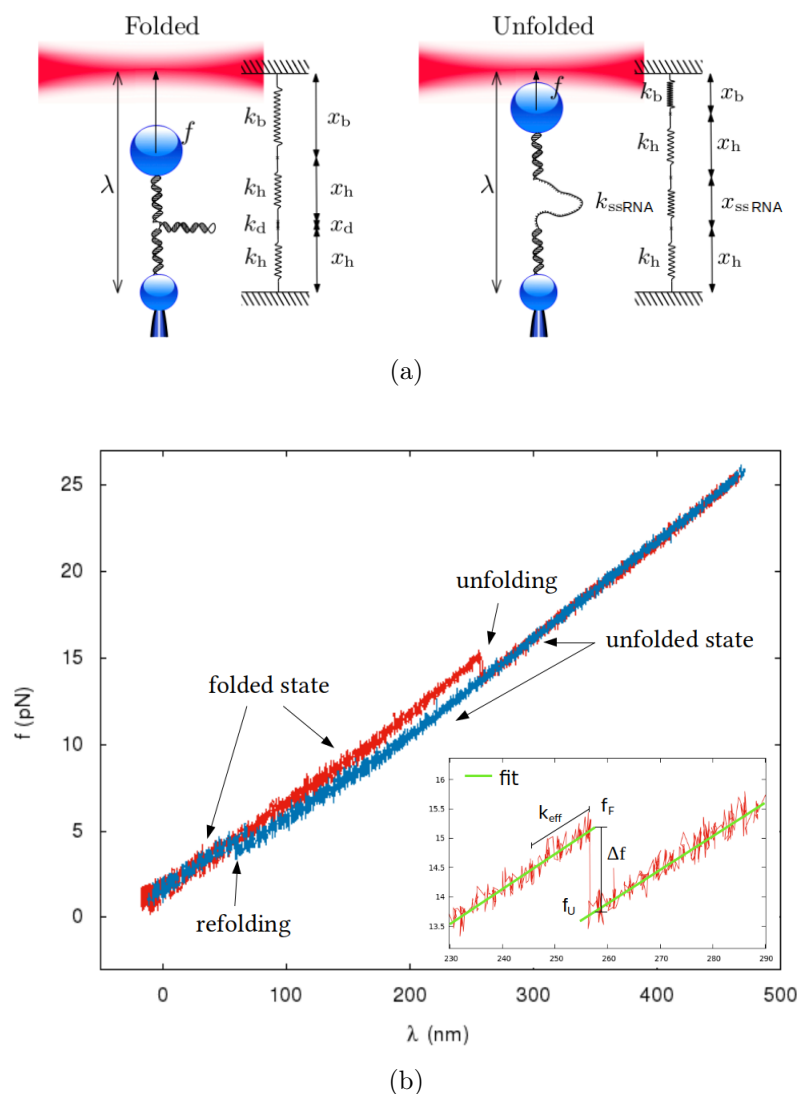


Figura 3.10: **Transizione tra lo stato F e lo stato U:** in (a) si ha la rappresentazione dell'hairpin nel caso dello stato F e dello stato U, con indicati i vari contributi nella forza elastica dati dalle varie parti del sistema molecolare; in (b) si ha un esempio dei grafici di forza che si ottengono in funzione della distanza  $\lambda$  tra la biglia SA e il centro della trappola ottica.

un valore di  $\lambda$  costante ( $\Delta\lambda=0$ ). Chiamando  $f_u$  e  $f_F$  le forze corrispondenti

alla transizione nel tratto di hairpin aperto e chiuso, si può scrivere:

$$\begin{aligned}\lambda(f_F) &= \lambda(f_U) \\ x_h(f_F) + x_b(f_F) + x_d(f_F) &= x_h(f_U) + x_b(f_U) + x_{ssRNA}(f_U).\end{aligned}\tag{3.25}$$

A questo punto, dividendo  $\Delta f_{F \rightarrow U}$  per la rigidità efficace quando l'hairpin è chiuso ( $k_{eff}^F$ ) si ottiene:

$$\begin{aligned}\frac{\Delta f_{F \rightarrow U}}{k_{eff}^F} &= \Delta f_{F \rightarrow U} \left( \frac{1}{k_h} + \frac{1}{k_b} + \frac{1}{k_d} \right) \\ &= \Delta x_h + \Delta x_b + \Delta x_d \\ &= [x_h(f_F) - x_h(f_U)] + [x_b(f_F) - x_b(f_U)] + [x_d(f_F) - x_{ssRNA}(f_U)].\end{aligned}\tag{3.26}$$

Sostituendo 3.25 in 3.26 si può ricavare la variazione di lunghezza dell'hairpin di RNA a partire dal salto della forza:

$$x_{ssRNA}(f_U) = \frac{\Delta f_{F \rightarrow U}}{k_{eff}^F} + x_d(f_U).\tag{3.27}$$

Pertanto, una volta misurati sperimentalmente i valori di  $\Delta f_{F \rightarrow U}$  e  $k_{eff}^F$  è possibile determinare il corrispondente allungamento della molecola indotto dalla transizione dallo stato chiuso a quello aperto.

### 3.4.2 Proprietà elastiche derivanti dall'analisi del salto della forza

Per studiare quindi la risposta elastica del sistema biologico studiato, sono state analizzate le curve di apertura e chiusura dell'hairpin (Fig. 3.10(b)) tramite dei programmi realizzati in Matlab: l'analisi viene effettuata sulle singole curve, effettuando un'interpolazione della zona lineare in prossimità del salto di forza, al fine di ottenere le rigidità del sistema  $k_{eff}^F$  e  $k_{eff}^U$  e i salti di forza  $\Delta f_{F \rightarrow U}$  e  $\Delta f_{U \rightarrow F}$  (Fig. 3.10(b)). A titolo di esempio si riportano in figura 3.11 alcune curve di apertura e chiusura del sistema a una velocità di pulling pari a 100 nm/s. Nel caso delle curve di folding del sistema, a

causa del rumore presente il salto di forza è poco ampio e reso poco visibile dal rumore del segnale registrato: si riporta pertanto uno zoom relativo a tre curve.

A partire da tale analisi si è potuto ricavare, tramite la formula (3.27), la variazione di lunghezza del CDL20 mRNA in ogni trasformazione da stato chiuso ad aperto e viceversa.

Il termine  $x_d(f_U)$  viene considerato come un singolo legame di lunghezza  $d$ , corrispondente al diametro della doppia catena nucleotidica (2 nm [5]), orientato lungo la direzione di applicazione della forza  $f$ . L'effettivo contributo di tale lunghezza lungo la direzione  $y$  può essere ricavato a partire dall'energia libera di Gibbs  $G$  del sistema:

$$x_d(f) = d\langle \cos\theta \rangle = -\frac{\partial G}{\partial f} = k_B T \frac{\partial \ln Z}{\partial f}, \quad (3.28)$$

dove  $\theta \in [0, \pi]$  è l'angolo formato dal legame rispetto alla direzione di azione della forza,  $k_B$  è la costante di Boltzmann,  $T$  la temperatura e  $Z$  la funzione di partizione del sistema.

Considerando il contributo energetico dato dalla proiezione di  $d$  come  $E = -fd\cos\theta$ , la funzione di partizione sarà proporzionale a

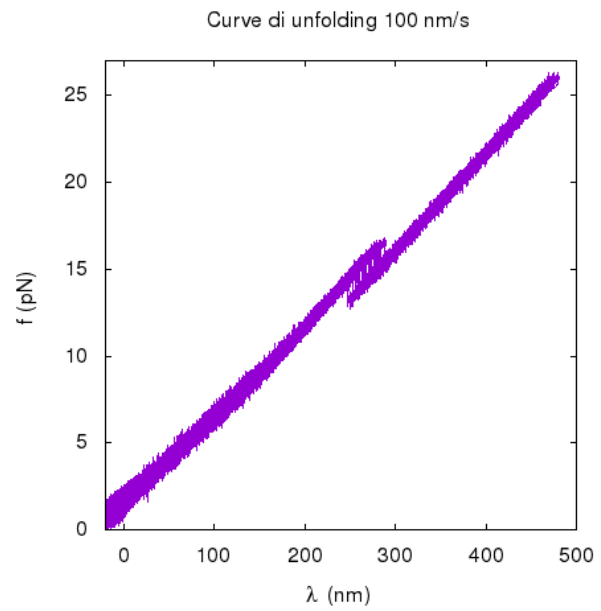
$$Z \propto \int_{-1}^1 d(\cos\theta) e^{\frac{fd\cos\theta}{k_B T}} = \frac{k_B T}{fd} \sinh\left(\frac{fd}{k_B T}\right). \quad (3.29)$$

Combinando quindi le equazioni 3.28 e 3.29, si ottiene

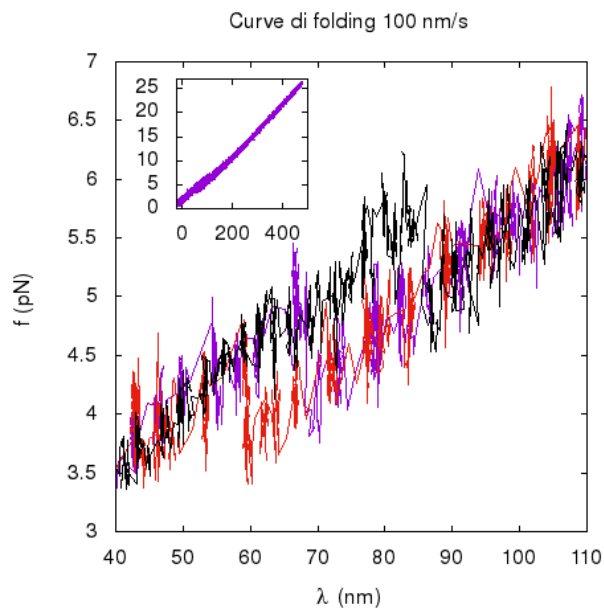
$$x_d(f) = d \left[ \coth\left(\frac{fd}{k_B T}\right) - \frac{k_B T}{fd} \right]. \quad (3.30)$$

Tale risultato coincide con la descrizione del comportamento elastico di una catena polimerica secondo il modello FJC.

Il primo aspetto che si vuole investigare è la risposta elastica della molecola CD4L20 sotto l'azione di forze esterne e in particolare se essa si comporti o meno come previsto dal modello del Worm Like Chain. In tale modello la relazione che lega la forza applicata con la variazione di lunghezza è data,



(a)



(b)

Figura 3.11: **Curve di pulling sperimentali:** nei grafici sono riportate come esempio delle curve di unfolding e folding raccolte a  $v=100$  nm/s.

come già discusso nella sezione 3.3.1, dall'equazione

$$f = \frac{k_B T}{P} \left[ \frac{1}{4(1 - \frac{x_{ssRNA}}{L})^2} - \frac{1}{4} + \frac{x_{ssRNA}}{L} + \sum_{n=2}^7 a_n \left( \frac{x_{ssRNA}}{L} \right)^n \right], \quad (3.31)$$

dove  $P$  è la lunghezza di persistenza ed  $L$  la lunghezza totale del sistema, detta anche lunghezza di contorno, che è data da  $X \cdot d_b$ , dove  $X$  è il numero di paia di basi, che sono aperte a quella data forza, e  $d_b$  è la distanza fra esse, pari a 0.665 nm/base per una catena di RNA [23, 25].

Come riportato in [25], i coefficienti  $a_i$  ( $i=1, \dots, 7$ ) sono trascurabili e possono essere posti pari a 0 nell'analisi. Per delle analisi più accurate si utilizzano dei valori numerici ( $a_2 = -0.5164228$ ,  $a_3 = -2.737418$ ,  $a_4 = 16.07497$ ,  $a_5 = -38.87607$ ,  $a_6 = 39.49944$ ,  $a_7 = -14.17718$ ) proposti da Bouchiat e collaboratori in [26].

Si sono quindi posti in grafico i valori di  $x_{ssRNA}$  medi ottenuti in funzione della forze di apertura e chiusura corrispondenti (Fig. 3.12) per ogni velocità di pulling investigata e si è effettuata un'interpolazione con la formula 3.31, considerando i coefficienti della sommatoria nulli.

I dati ottenuti rispettano l'andamento previsto dal modello WLC, confermando la validità della modellizzazione della catena nucleotidica anche per l'hairpin CD4L20.

L'interpolazione con il modello WLC permette di determinare i principali parametri elastici del sistema, ossia la lunghezza di persistenza  $P$  e quella di contorno  $L$ . I valori di  $P$  ed  $L$  ottenuti dall'interpolazione sono riportati in tabella (3.1); il valore di  $P$  è in ottima compatibilità con quello già riportato in letteratura per un RNA con la stessa sequenza nucleotidica, pari a  $(0.75 \pm 0.05)$  nm [23]. Come indicato sopra, dal valore di  $L$  è possibile ricavare il numero medio di nucleotidi che si sono aperti o chiusi durante le transizioni configurazionali: si ottiene un numero di basi pari a  $62 \pm 1$ , compatibile con il numero di nucleotidi che compongono l'hairpin.

Tuttavia, il valore di  $L$  riportato in tabella 3.1 è un valore medio che tiene conto di tutte le varie curve di pulling registrate a diversa velocità e pertanto non mette in evidenza l'eventuale presenza di stati di transizione

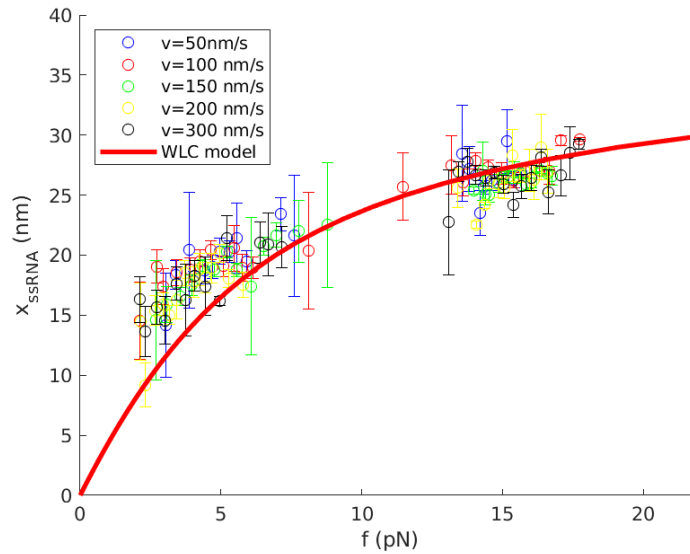


Figura 3.12: **Allungamento della catena:** si riportano i valori dell'allungamento del CD4mRNA mediati ad ogni intervallo di forze, ottenuti alle varie velocità di pulling. I valori sono stati interpolati secondo il modello WLC.

|          |                 |
|----------|-----------------|
| $P$ (nm) | $0.69 \pm 0.05$ |
| $L$ (nm) | $41.5 \pm 0.9$  |

Tabella 3.1: **Parametri WLC:** si riportano i parametri elastici dell'hairpin CD4L20 mRNA ottenuti tramite l'analisi delle curve sperimentali di pulling a varie velocità.

e non chiarisce il meccanismo di apertura e chiusura dell'hairpin. L'hairpin potrebbe infatti aprirsi o chiudersi in tre modalità:

- **Cooperativa:** le coppie di nucleotidi che compongono lo *stem* dell'hairpin si aprono/chiudono contemporaneamente (Fig. 3.13c);
- **Non cooperativa:** le coppie di nucleotidi si aprono in maniera indipendente, una alla volta (Fig. 3.13a);
- **Mista:** il sistema inizia ad aprirsi/chiudersi in maniera non cooperativa, per poi transire improvvisamente alla nuova configurazione in maniera cooperativa.



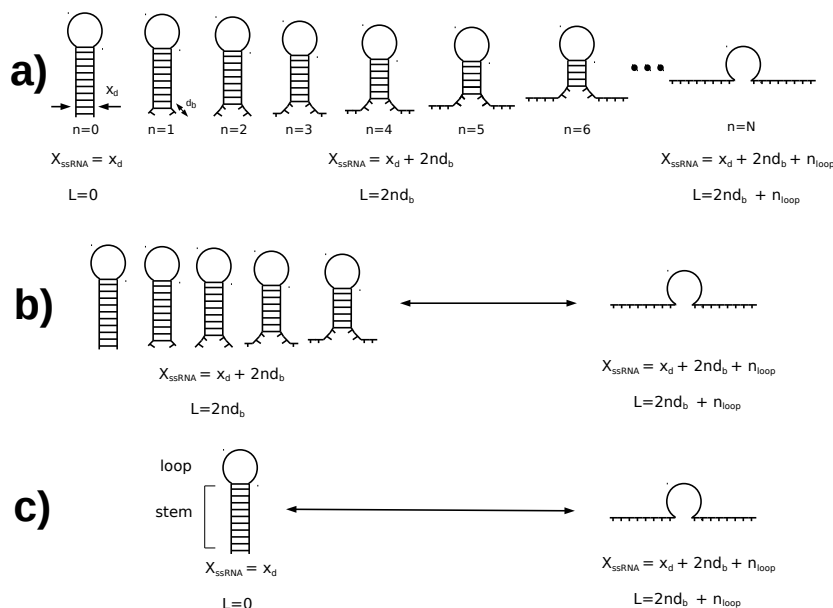


Figura 3.13: **Transizione non cooperativa e cooperativa per un hairpin:** in a) è schematizzata una transizione non cooperativa, in cui le paia di basi si separano una alla volta. Con  $n$  sono indicato il numero di basi aperte. In b) è rappresentato il caso intermedio, in cui il sistema inizialmente si apre in maniera non cooperativa per poi transire alla configurazione finale cooperativamente; in c) è rappresentato il caso cooperativo.

Si è quindi ritenuto opportuno realizzare un'analisi puntuale di ogni curva di pulling per ottenere il numero di nucleotidi aperti (o chiusi) in ogni singolo processo. Dall'analisi delle curve infatti è possibile rilevare solamente il numero di nucleotidi che si sono aperti o chiusi in maniera cooperativa poichè nel caso non cooperativo, la forza varia in maniera più graduale e non contribuisce al salto. Pertanto se l'hairpin si apre o chiude completamente in maniera non cooperativa non si osserva alcun salto di forza; se invece l'apertura/chiusura è completamente cooperativa ad ogni processo il numero di nucleotidi coinvolti sarebbe uguale al numero totale di nucleotidi che compongono la catena polimerica. Infine, se il sistema si apre/chiede prima cooperativamente e poi non cooperativamente, nella distribuzione si osserverebbe un picco corrispondente a un numero di nucleotidi minore rispetto

a quello noto del sistema in studio, oppure più picchi, a seconda di quanti nucleotidi sono coinvolti durante le transizioni che avvengono in maniera cooperativa.

A partire dai valori di  $L$  ottenuti dall'analisi di ogni salto è stato ottenuto il numero di nucleotidi aperti/chiusi tramite il rapporto  $L/d_b$ , ed è stato realizzato un istogramma al fine di studiarne la distribuzione (Fig. 3.14). Il fatto che la distribuzione si presenti monomodale, piccata attorno a 60, significa che durante i cambiamenti di configurazione si aprono e chiudono in media 60 nucleotidi, ovvero che l'hairpin studiato si apre e si chiude sempre completamente, in maniera totalmente cooperativa.

Un'altra importante osservazione riguarda il fatto che la distribuzione ottenuta sembra evidenziare che l'hairpin CD4L20 si comporti come un sistema a due stati, quello nativo (F) e quello dispiegato (U), senza la presenza di stati intermedi tra i due. Tale deduzione sarà confermata in seguito nel capitolo 4 da un'analisi cinetica dei dati acquisiti.

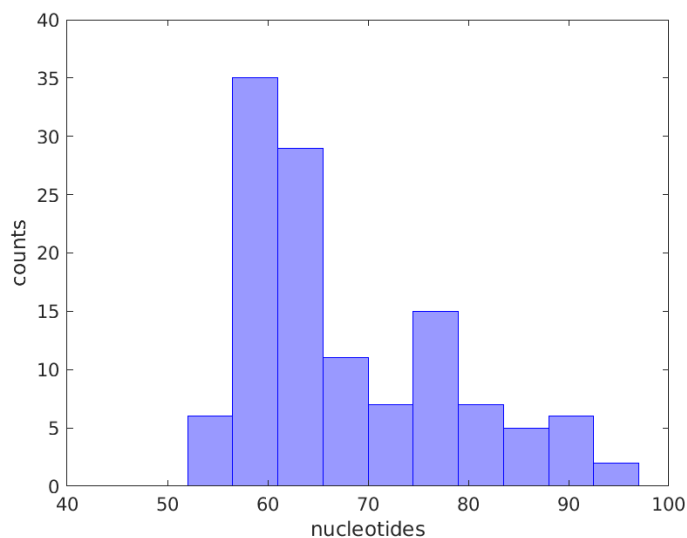


Figura 3.14: **Numero di nucleotidi aperti:** si riporta la distribuzione del numero di nucleotidi che si sono aperti e chiusi durante il cambiamento di configurazione della molecola CD4L20 negli esperimenti di pulling.

### 3.5 Energia libera del sistema

Lo studio e la manipolazione di singole molecole tramite la tecnica delle pinzette ottiche permette di ottenere importanti informazioni riguardo la cinetica e la termodinamica dei sistemi studiati.

A partire da una ricostruzione delle energie in gioco è possibile dedurre quali siano le configurazioni più probabili che il sistema molecolare assumerà al variare di determinati parametri sperimentali, come la temperatura, la concentrazione di sali nella soluzione in cui si trova la molecola, o le forze esterne ad essa applicate.

Per *Free Energy Landscape* (FEL) si intende la mappa di tutte le possibili configurazioni di un sistema e delle corrispettive energie libere; esso è pertanto un potente strumento per l'individuazione delle configurazioni che sono favorite o sfavorite dal punto di vista energetico e consente di mettere in evidenza la presenza di stati di transizione o di mal ripiegamento del sistema biologico. Nel FEL ogni configurazione è identificata tramite una o più coordinate di reazione, che possono essere utilizzate anche per indicare il grado di evoluzione di un determinato processo biochimico (Fig. 3.15). Come coordinate si possono utilizzare gli angoli di legame tra i monomeri di un polimero, la lunghezza della molecola, il numero di coppie di basi nucleotidiche aperte, o anche parametri esterni, come ad esempio le forze esterne o la temperatura [22].

A titolo di esempio in figura 3.15a si riporta un FEL unidimensionale in cui la coordinata di reazione ( $n$ ) rappresenta il numero di basi aperte nelle varie configurazioni energetiche del sistema. In particolare, i vari minimi locali dell'energia libera costituiscono gli stati stabili del sistema (N, I e U in figura 3.15a), mentre i massimi sono gli stati transizionali (TS). Nel passaggio quindi da uno stato stabile a un'altro, il sistema attraverserà almeno uno stato transizionale.

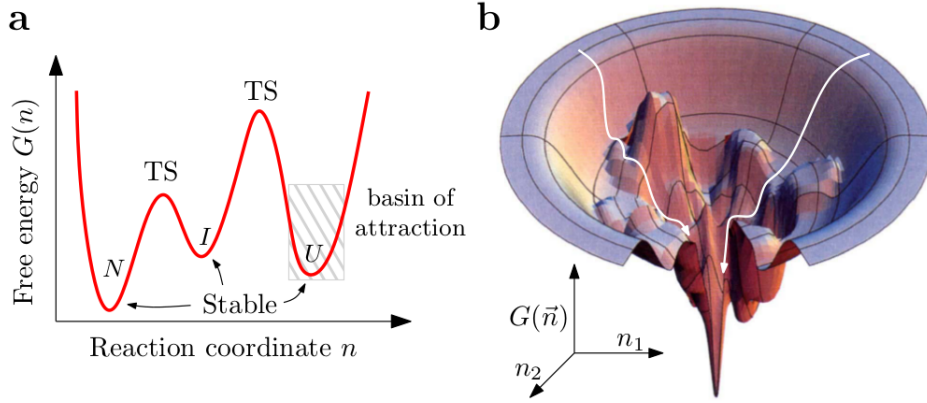


Figura 3.15: **Free Energy Landscape** [5]. In **a** è rappresentato il caso unidimensionale, con un'unica coordinata di reazione; in **b** è rappresentato il caso tridimensionale. Le frecce bianche indicano due diversi percorsi, entrambi possibili, che portano due diversi stati iniziali ad alta energia verso lo stato più stabile, ad energia minima.

### 3.5.1 Energia libera di un acido nucleico sotto azione di una forza esterna

Nel caso dell'hairpin di RNA studiato si può usare come coordinata di reazione  $n$ , ossia il numero di coppie di nucleotidi aperte nelle varie configurazioni che attraversa il sistema molecolare nel passaggio dallo stato chiuso ( $n = 0$ ) allo stato aperto ( $n=N$ ) (Fig. 3.13a). Il sistema molecolare è soggetto a una forza di pulling, che determina i cambiamenti di stato dell'hairpin e quindi anche il cambiamento del valore di  $n$ .

Ad una determinata forza  $f$ , l'energia libera del sistema presenta tre principali contributi:

$$\Delta G_n(f) = \Delta G_n^0 + \Delta G_n^{st}(f) + \Delta G_n^d(f), \quad (3.32)$$

dove  $\Delta G_n^0$  è l'energia libera di formazione del sistema a forza nulla,  $\Delta G_n^{st}(f)$  corrisponde al lavoro necessario per tirare la catena nucleotidica e  $\Delta G_n^d(f)$  è il contributo energetico che deriva dall'orientamento del dipolo dell'hairpin lungo la direzione della forza applicata.

### Energia libera di formazione del sistema a forza nulla

Il primo termine dell'equazione 3.32 rende conto dell'energia necessaria perchè l'hairpin si apra, a partire da una configurazione con  $n$  coppie di nucleotidi aperte, a forza nulla. Tale contributo si può ottenere andando a considerare l'energia libera della base stessa e delle basi vicine nella direzione 3'-5' della sequenza nucleotidica. L'energia libera di ogni paia di basi,  $g_{i,i+1}$  contiene l'energia di formazione del legame idrogeno che unisce i nucleotidi complementari, l'interazione tra due nucleotidi successivi e la perdita di entropia dovuta alla formazione dei legami. Considerando quindi un modello a primi vicini, si può scrivere l'energia libera come

$$G_n^0 = \sum_{i=n+1}^{N-1} g_{i,i+1} + g_{loop}(1 - \delta_{nN}), \quad (3.33)$$

dove il primo termine è l'energia libera di formazione dello stem e dipende dalla sequenza nucleotidica, mentre  $g_{loop}$  è l'energia libera di formazione del loop e  $\delta_{nN}$  è la delta di Kronecker, pari a 1 se  $n=N$ , e 0 altrimenti. Il contributo  $g_{loop}$  è una quantità positiva, in quanto il loop è una struttura entropicamente non favorita.

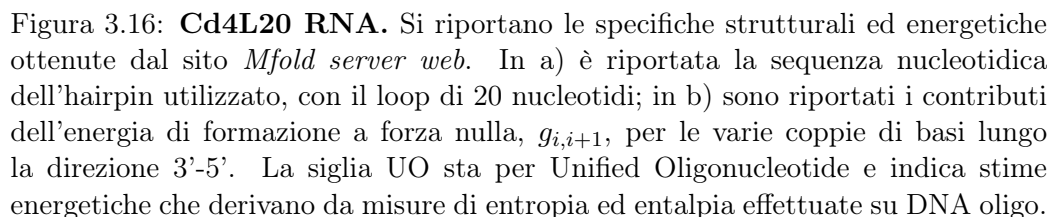
I valori necessari per il calcolo di  $G_n^0$ , riportati nella tabella di figura 3.16, sono stati calcolati tramite il modello a primi vicini [5, 31, 32] sulla base di misure di spettroscopia ottica a raggi UV. Il valore di  $g_{loop}$ , ottenuto tramite il sito *Mfold web server*, risulta pari a 3.37 kcal/mol.

### Energia libera di stretching

Come già sottolineato in figura 3.13, ad ogni base che si apre, la lunghezza al contorno  $L$  della molecola aumenta di  $2nd_b$ , dove  $d_b$  è la distanza tra i vari nucleotidi. Considerando quindi una generica configurazione con  $n$  basi aperte, la lunghezza al contorno dell'hairpin sarà pari a

$$L_n = (2n + n_{loop}\delta_{nN})d_b. \quad (3.34)$$

$\Delta G_n^{st}$  corrisponde al lavoro necessario a tirare o rilasciare la molecola nella configurazione con  $n$  nucleotidi aperti fino al raggiungimento di un allunga-



mento  $x_n(f)$  sotto l'azione della forza  $f$ . Dal momento che la molecola obbedisce al modello WLC,  $x_n(f)$  può essere ottenuto usando la relazione del modello WLC usata nella precedente sezione (formula 3.31), che in questo caso diventa:

$$f = \frac{k_B T}{P} \left[ \frac{1}{4(1 - x_n/L_n)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x_n}{L_n} + \sum_{n=2}^7 a_n \left( \frac{x_n}{L_n} \right)^2 \right]. \quad (3.35)$$

L'energia libera risulterà quindi pari a

$$\Delta G_n^{st}(f) = - \int_0^f x_n(f') df'. \quad (3.36)$$

Tale contributo è stato quindi calcolato utilizzando la formula 3.34 per la lunghezza al contorno  $L_n$  e il valore di  $P$  sperimentale ricavato nella sezione precedente (tabella 3.1). Tale energia non contribuisce quando  $n = 0$ , dal momento che non vi è allungamento del sistema.

A tale termine di stretching del sistema molecolare è stato aggiunto anche un contributo energetico elastico del sistema che contribuisce fino a quando l'hairpin non si apre completamente. Tale energia è pari a

$$\Delta G = \frac{1}{2} k_{eff} x_n^2, \quad (3.37)$$

dove  $k_{eff}$  è la costante elastica media del sistema che comprende la rigidità della trappola, le maniglie e l'hairpin con almeno una coppia di basi chiusa.

### Energia libera di orientamento del diametro dell'hairpin

L'ultimo termine dell'equazione 3.32 è il contributo energetico relativo al diverso orientamento del dipolo con cui l'hairpin è approssimato lungo la direzione di azione della forza di pulling, già presentato in equazione 3.28. L'energia libera si può calcolare a partire dalla funzione di partizione  $Z$  in formula 3.29 e risulta pari a

$$\begin{aligned} \Delta G_n^d &= -k_B T \ln Z \cdot (1 - \delta_{nN}) \\ &= -k_B T \ln \left[ \frac{k_B T}{fd} \sinh \left( \frac{fd}{k_B T} \right) \right] \cdot (1 - \delta_{nN}). \end{aligned} \quad (3.38)$$

Come si deduce dalla presenza della delta di Kronecker,  $G_n^d$  è nullo quando l'hairpin si trova nella configurazione in cui è completamente aperto ( $n=N$ ), e quindi l'hairpin non è più modellizzabile con un dipolo di lunghezza  $d$ .

L'energia totale teorica dei diversi stati è stata quindi calcolata tramite i tre diversi contributi al variare di  $n$ , per valori di forza  $f$  fissati. I FEL unidimensionali ottenuti sono stati riportati in figura 3.17.

Come si nota dall'andamento delle curve, a forze basse ( $f=1$  pN), l'energia libera presenta un minimo corrispondente a  $n=0$ , che corrisponde all'hairpin nella configurazione chiusa. Al contrario, a forze alte ( $f=20$  pN) il sistema

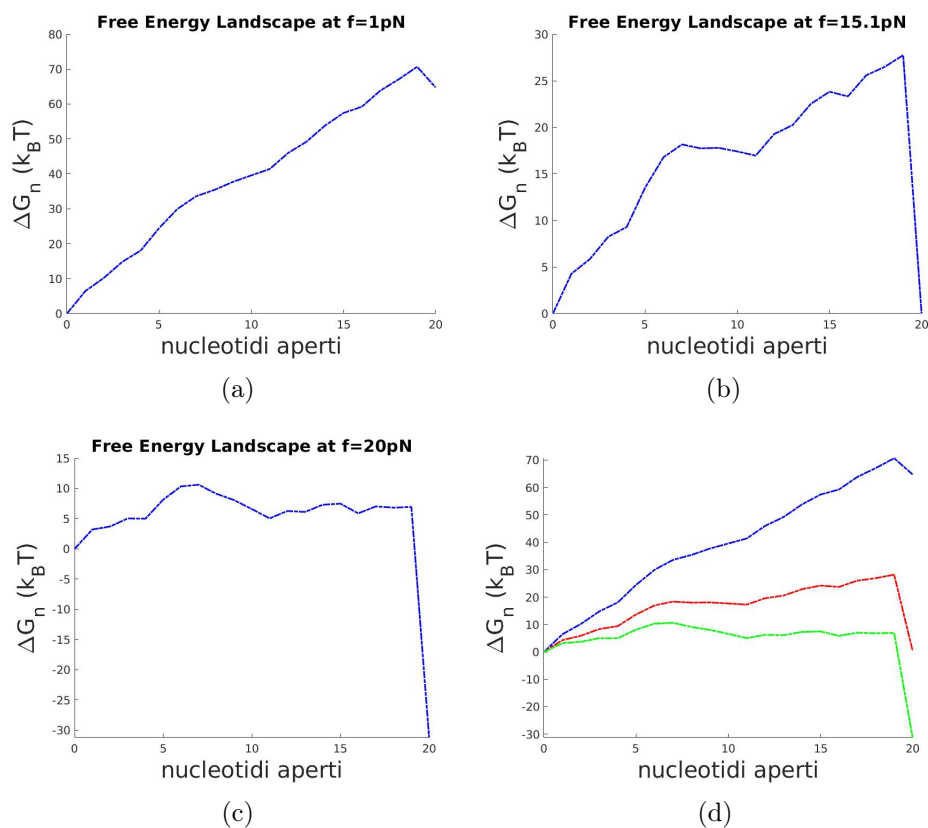


Figura 3.17: **FEL CD4L20 RNA**. Nei grafici sono riportati gli andamenti dell'energia libera al variare del numero di nucleotidi aperti, calcolati nel caso di tre diverse forze applicate al sistema molecolare: 0 pN, 15.1 pN e 20 pN. In c) le curve sono riportate assieme al fine di seguire l'andamento della barriera al variare della forza.

preferirà assumere la configurazione con tutte le basi aperte, dal momento che l'energia del sistema risulta minore nella configurazione con tutte le basi aperte ( $n = N$ ) rispetto al caso in cui  $n = 0$ . A forze ancora maggiori ( $f > 20\text{ pN}$ ) il processo di allungamento risulta avere una barriera nulla, ossia lo stato con tutte le basi chiuse ( $n = 0$ ) risulta quello maggiormente sfavorito dal punto di vista energetico.

Oltre a ciò, in tutte le curve riportate si osserva inoltre un picco energetico in corrispondenza della configurazione con  $n = 5 - 6$ , ossia la situazione in cui le prime 5-6 basi dello stem, a partire dall'estremità, risultano aperte. Tale risultato è ragionevole, tenendo conto del fatto che le basi 5-6 sono quelle



la cui energia di formazione è maggiore, come si può notare in figura 3.16 in corrispondenza delle coppie di basi CC/GG e GC/CG. Pertanto l'energia richiesta per rompere tali legami è maggiore rispetto a quella necessaria per aprire altre basi e ciò giustifica il picco osservato nel profilo di energia libera corrispondente a tale configurazione.

In grafico 3.17(b) vi è il diagramma dell'energia libera a 15.1 pN: a tale forza i due stati a  $n = 0$  e  $n = 20$  presentano la stessa energia, ossia sono energeticamente equiprobabili. Tale valore viene chiamato per convenzione *forza di coesistenza* ( $f_c$ ), alla quale vi è una probabilità uguale che il sistema assuma una configurazione aperta o chiusa. La stima teorica di  $f_c$  nel nostro sistema ottenuta dal calcolo teorico del FEL appena effettuato, risulta pari a  $f_c = (15.1 \pm 0.4)$  pN, il cui errore deriva dai diversi valori di  $f_c$  considerando una lunghezza di persistenza  $P$  che varia entro il suo errore sperimentale.

Tuttavia tale definizione della forza di coesistenza è sicuramente corretta nel caso di una barriera di potenziale simmetrica. Come si osserva invece dal grafico 3.17(b) la barriera dell'hairpin CD4L20 è fortemente sbilanciata verso lo stato aperto e quindi lo stato transizionale è più vicino allo stato aperto che allo stato chiuso a causa del contributo energetico del loop. Pertanto a priori non è possibile affermare che i due stati siano equiprobabili nonostante presentino la stessa energia libera. In tali casi si è soliti considerare come forza di coesistenza la forza alla quale la distribuzione di probabilità dello stato aperto è pari a  $1/2$ , analisi che verrà affrontata nel prossimo capitolo.

## Capitolo 4

# Misura sperimentale dell'energia libera del sistema

Come già spiegato nel capitolo precedente, uno studio energetico del sistema molecolare investigato permette di estrarre importanti informazioni sulle configurazioni che esso può assumere al variare di determinati parametri fisici. Recenti studi hanno osservato come l'estensione molecolare sia una buona coordinata di reazione per monitorare l'apertura o chiusura del sistema sotto l'azione di una forza esterna [29]. Il parametro sperimentale da cui partire per estrarre informazioni energetiche sul sistema è la forza ( $f$ ) che agisce ad un'estremità della molecola durante le misure di pulling.

### 4.1 Dynamic force spectroscopy

Lo studio delle forze a cui avvengono le transizioni dello stato tra la configurazione chiusa dell'hairpin e quella aperta prende il nome di *dynamic force spectroscopy* (DFS). Come già spiegato nella sezione 3.4.2, le transizioni tra i due stati si rilevano da salti improvvisi della forza a cui il sistema è sottoposto, che corrispondono all'estensione o al ripiegamento della catena di mRNA in seguito allo scioglimento o alla formazione dei legami tra le basi dell'hairpin. Queste variazioni nella lunghezza della catena causano uno spostamento della biglia rispetto al centro della trappola, determinando quindi una varia-

zione nella forza rilevata dai detector PSD (si veda il capitolo 2). I salti di forza corrispondono quindi a un cambiamento configurazionale dell'hairpin che passa dallo stato chiuso a quello aperto e viceversa. Tramite misure di pulling si può quindi studiare la distribuzione di tali forze di transizione, al fine di ottenere informazioni sulla cinetica e sulla termodinamica del processo in esame.

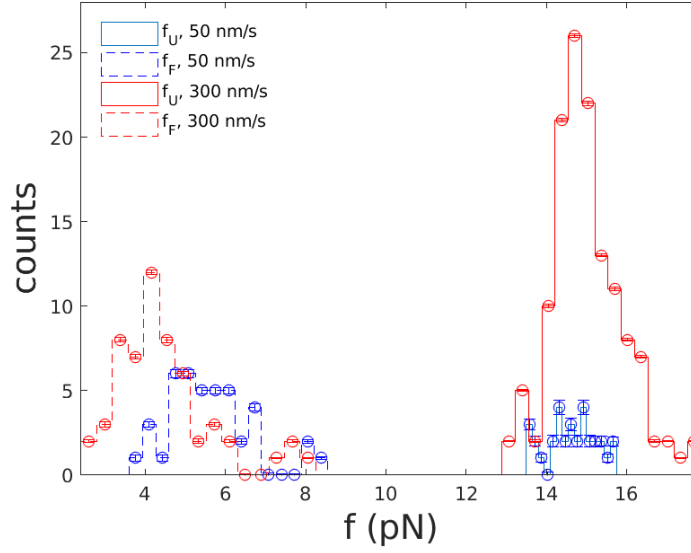
Sono state effettuate misure muovendo la trappola a diversa velocità, 50 nm/s, 100 nm/s, 150 nm/s, 200 nm/s e 300 nm/s, al fine di vedere se tale parametro influenzi significativamente la risposta del sistema molecolare. Durante le misure di pulling le forze applicate sul sistema variano in un range da 0 pN a circa 25 pN. Alcune delle curve sperimentali ottenute alle diverse velocità sono riportate in figura 4.3.

Come si osserva dalle curve sperimentali, le forze di folding e unfolding variano all'interno di un intervallo definito, i cui estremi non variano sensibilmente al variare della velocità di pulling. Tutte le curve sono state analizzate, ottenendo la forza di apertura dell'hairpin, la costante elastica  $k_{eff}$  del sistema e il salto della forza  $\Delta f$ . Sono stati quindi costruiti degli istogrammi su tali intervalli di forza, al fine di osservare i valori di forza in cui è possibile che il sistema si apra o si richiuda.

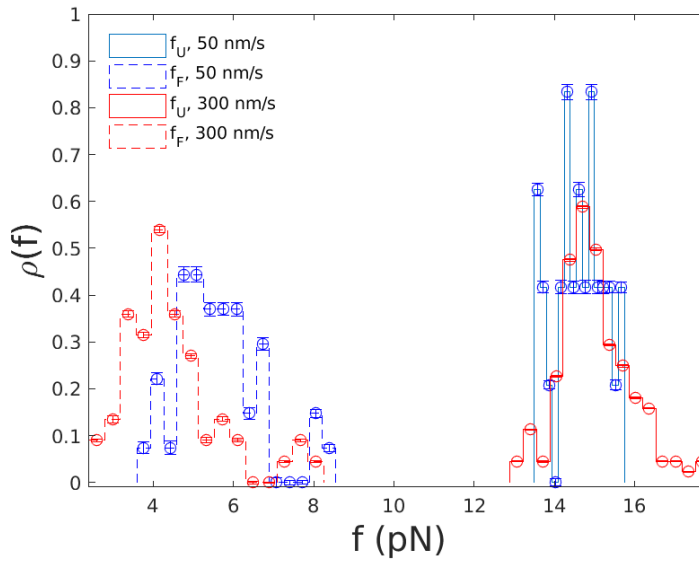
In figura 4.1 sono riportati gli istogrammi delle forze di apertura e chiusura dell'hairpin ottenuti, relativi alla minima e alla massima velocità di pulling utilizzata.

L'isteresi osservata, intesa come la distanza tra le distribuzioni di forze di folding e unfolding, è legata alla struttura della molecola studiata: l'hairpin utilizzato, con un loop di 20 nucleotidi, presenta infatti molta più isteresi rispetto a quella rilevata nel caso dell'hairpin CD4 mRNA standard, che presenta un loop formato da soltanto 4 nucleotidi. Come confronto si riportano in figura 4.2 gli istogrammi relativi alle molecole CD4L4 [5] e CD4L20.

Si noti come l'isteresi aumenti leggermente all'aumentare della velocità di pulling: ciò può essere imputato al fatto che ad alte velocità di pulling il sistema non ha abbastanza tempo per raggiungere l'equilibrio termodinamico con lo stato di transizione e necessita quindi di forze maggiori per passare dallo stato nativo a quello aperto e viceversa.



(a)



(b)

Figura 4.1: **Istogrammi delle forze di folding e unfolding.** In a) sono rappresentati gli istogrammi delle forze di apertura e chiusura dell'hairpin per le due velocità di pulling  $v=50$  nm/s e  $v=300$  nm/s. In b) sono riportati gli stessi istogrammi, ma normalizzati.

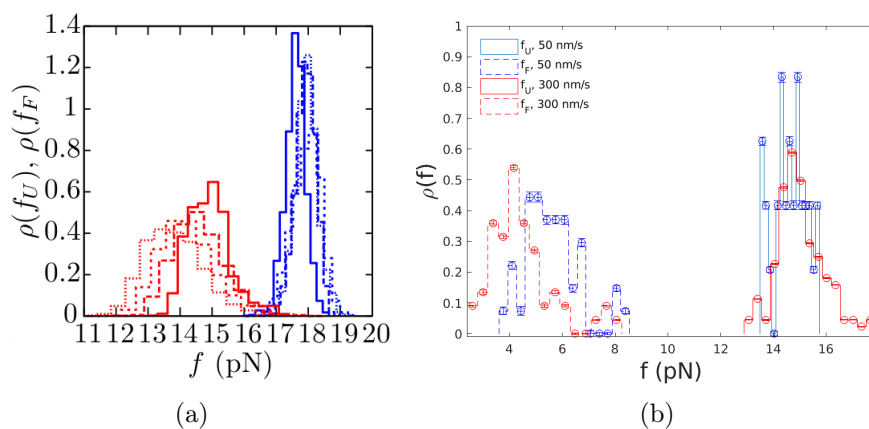


Figura 4.2: **Confronto CD4L4-CD4L20.** Si riportano gli istogrammi di distribuzione delle forze di apertura e chiusura di dello stesso sistema molecolare (hairpin CD4 mRNA) con due loop diversi, di 4 [5] e 20 basi rispettivamente.

Come già osservato nella sezione 3.4.2, la transizione tra lo stato chiuso e aperto è apparentemente un processo termodinamico a 2 stati. Questo è confermato dalla distribuzione delle forze presentata negli istogrammi: se vi fossero stati energetici intermedi nel passaggio tra le due configurazioni, ad esempio aperture o chiusure a più stadi, si sarebbero ottenute delle distribuzioni multimodali.

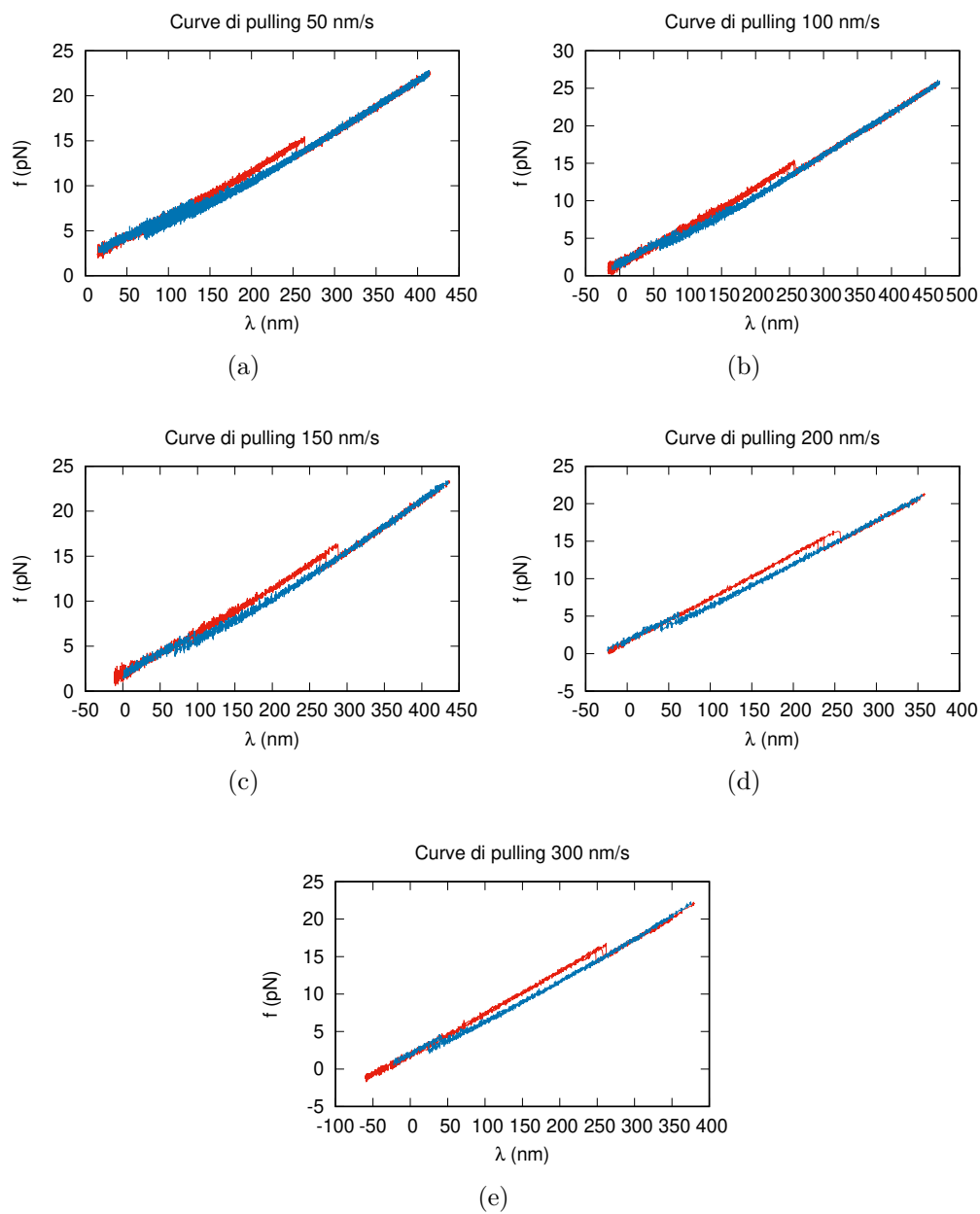
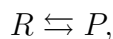


Figura 4.3: **Curve di pulling sperimentali:** nei grafici sono riportate a titolo d'esempio alcune delle curve di pulling raccolte alle diverse velocità di 50 nm/s, 100 nm/s, 150 nm/s, 200 nm/s e 300 nm/s.

## 4.2 Teoria degli stati transizionali

Per modellizzare il passaggio di un sistema termodinamico da una configurazione a un'altra, si utilizza un formalismo ereditato dalla chimica: dati i reagenti (R) e i prodotti finali P, si può scrivere la reazione come



dove la costante di equilibrio tra i due stati viene definita come il rapporto tra la concentrazione di prodotti e reagenti:

$$K_{eq} = \frac{[P]_{eq}}{[R]_{eq}}.$$

Affinchè la reazione avvenga bisogna che i prodotti si trovino in forma attiva ( $R^*$ ) ossia in uno stato energetico transizionale:



dove i reagenti che diventeranno effettivamente prodotti ( $R^*$ ) sono in equilibrio con i restanti reagenti ( $R$ ). La costante cinetica della reazione,  $k_{\rightarrow}$  sarà quindi proporzionale alla costante di equilibrio:  $k_{\rightarrow} \propto K_{eq}$

Dall'equazione di Van't Hoff [33] si ricava l'espressione che lega la costante cinetica della reazione chimica all'energia di attivazione del sistema  $E^\ddagger$ , definita come la differenza di energia tra i reagenti attivi e quelli nello stato passivo:

$$\frac{d \log k_{\rightarrow}}{dT} = \frac{\Delta E^\ddagger}{k_B T}, \quad (4.2)$$

che, risolta, dà

$$k_{\rightarrow} = k_0 e^{-\frac{\Delta E^\ddagger}{k_B T}} \quad (4.3)$$

Questa energia di attivazione può essere vista come una barriera energetica che i reagenti devono superare per raggiungere lo stato attivo  $R^*$ , il quale è visto come uno stato transizionale (TS) lungo il processo della reazione (Fig. 4.4a).

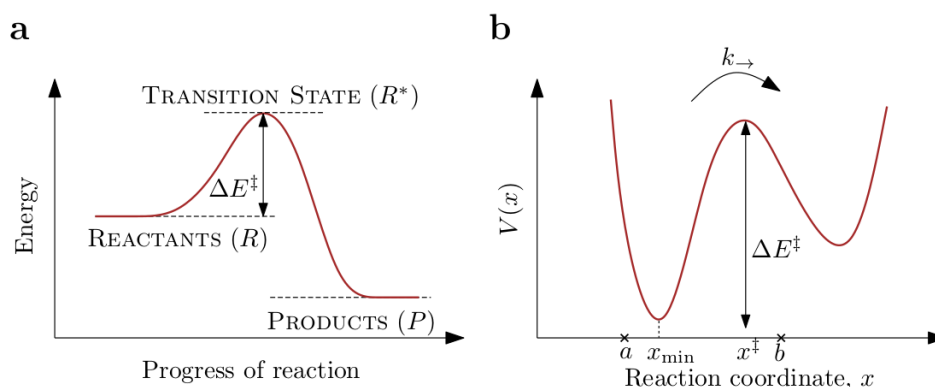


Figura 4.4: **Profilo energetico di una reazione chimica [5].** In **a** è rappresentata la reazione attraverso l'energia che caratterizza i vari processi. In **b** è rappresentato lo stesso concetto, ma in termini del potenziale  $V$ , in funzione della coordinata di reazione  $x$ .

Il profilo energetico della reazione, uscendo dal contesto chimico, può essere disegnato come in figura 4.4, in cui si identificano gli stati energetici tramite un potenziale  $V(x)$  al variare di una coordinata di reazione  $x$ . I reagenti si trovano nella buca di potenziale a sinistra della barriera, i prodotti a destra. Questo modello può essere usato anche per studiare il comportamento energetico della catena nucleotidica sottoposta a pulling. Infatti, l'allungamento molecolare nella direzione di azione della forza può essere visto come un processo termodinamico in cui le due possibili configurazioni del sistema, aperto o chiuso, vengono identificate nel ruolo di reagenti e prodotti, tra i quali è presente almeno uno stato transizionale  $R^*$  (TS).

L'analisi delle costanti cinetiche del sistema permette quindi di ottenere importanti informazioni sul profilo energetico della molecola, come l'energia libera della stessa, o la forza alla quale gli stati aperto o chiuso sono energeticamente equiprobabili. Da tale approccio nascono i modelli di Bell-Evans e di Kramers che permettono di estrarre i parametri energetici del sistema in studio a partire dalle costanti cinetiche del sistema, ottenute sperimentalmente.



### 4.2.1 Stima delle costanti cinetiche sperimentali

Per estrarre le costanti cinetiche del sistema è possibile partire dalla probabilità di sopravvivenza, intesa come la probabilità che un sistema si mantenga in una certa configurazione (*folded* o *unfolded*) al variare della forza ( $P_F(f)$  o  $P_U(f)$ ).

Queste probabilità si possono calcolare a partire dagli istogrammi di figura 4.1(b), secondo le seguenti espressioni:

$$\begin{aligned} P_F(f) &= 1 - \int_0^f \rho(f_U) df_U \\ P_U(f) &= + \int_0^f \rho(f_F) df_F \end{aligned} \tag{4.4}$$

Le probabilità di sopravvivenza ottenute nei casi di due diverse velocità di pulling ( $v = 100$  nm/s,  $v = 300$  nm/s) sono riportate in figura 4.5. In particolare, le curve  $P_F$  relative alla probabilità di sopravvivenza dello stato nativo (chiuso) sono state ottenute a partire da misure di apertura (unfolding) della molecola, mentre la probabilità di sopravvivenza dello stato aperto deriva dall'analisi delle curve di ripiegamento (folding) del sistema biologico studiato. Osservando le curve in figura 4.5(b) si può notare come all'aumentare della forza la probabilità di sopravvivenza dello stato nativo cali progressivamente, passando da un valore massimo pari a 1 per  $f = 12$  pN a quello minimo di 0 in  $f = 20$  pN. Ciò è comprensibile, tenendo conto che nel processo di pulling si promuove l'apertura dell'hairpin di RNA, partendo da una configurazione in cui la molecola è chiusa per arrivare poi nella situazione in cui essa sia aperta. Pertanto, all'aumentare della forza di pulling aumenta la probabilità che l'hairpin transisca da stato chiuso ad aperto, e di conseguenza cala la probabilità che la molecola permanga (sopravviva) nello stato di partenza. Considerazioni del tutto simili valgono per le curve in figura 4.5(a) dove però lo stato energetico di partenza è quello di apertura, del quale si stima la probabilità di sopravvivenza nella fase di ripiegamento del sistema.

Assumendo che la configurazione nell'istante  $t$  dipenda solamente da quella assunta dall'istante appena precedente, l'evoluzione del sistema si può

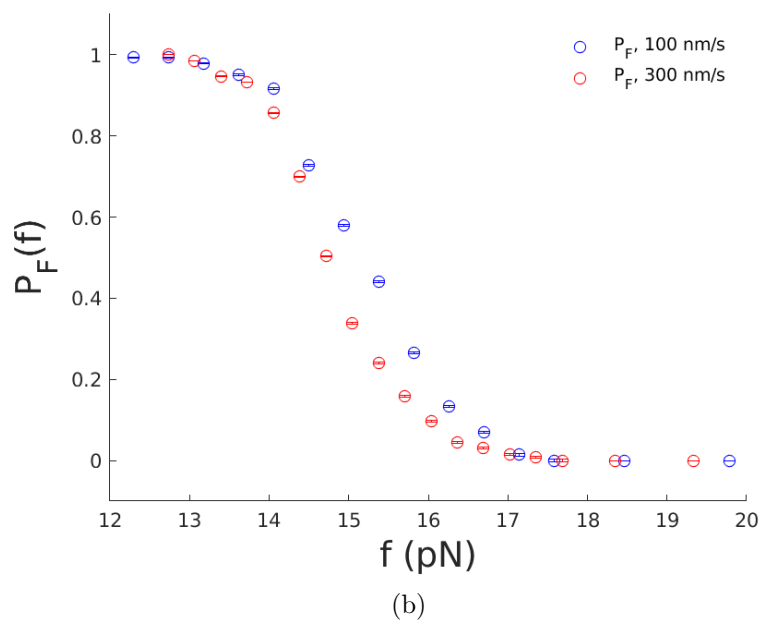
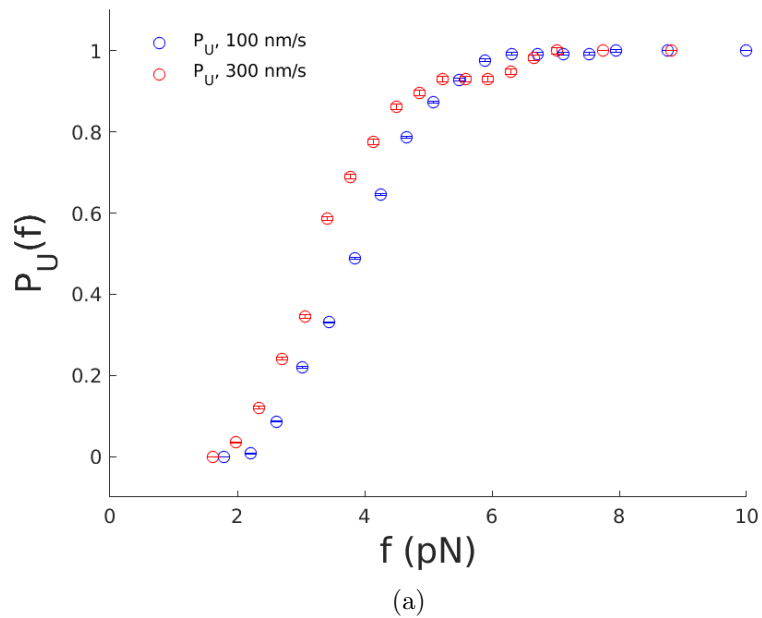


Figura 4.5: **Probabilità di sopravvivenza.** A titolo di esempio si riportano le curve di probabilità di sopravvivenza degli stati nativo (folded) e aperto (unfolded) relative alle curve di pulling ottenute alle velocità  $v = 100$  nm/s e  $v = 300$  nm/s.

trattare come un processo Markoviano al primo ordine [34]. Partendo da questa ipotesi si ottengono le seguenti espressioni che legano la probabilità di sopravvivenza di una certa configurazione del sistema alle costanti cinetiche caratteristiche del processo:

$$\begin{aligned}\frac{dP_N(f)}{df} &= -\frac{k_{F \rightarrow U}(f)}{r} P_F(f) \\ \frac{dP_U(f)}{df} &= -\frac{k_{U \rightarrow F}(f)}{r} P_U(f)\end{aligned}\tag{4.5}$$

dove  $r = vk_{eff}$  è il rate di transizione del sistema, definito dal prodotto tra la velocità di pulling  $v$  e la rigidità del sistema  $k_{eff}$ , e  $k_{F \rightarrow U}(f)$  e  $k_{U \rightarrow F}(f)$  sono le costanti cinetiche di apertura e chiusura dell'hairpin, ossia della transizione da stato piegato (F) ad aperto (U)  $F \rightarrow U$ , e viceversa. Una volta nota la probabilità di sopravvivenza di uno stato è quindi possibile ricavare la costante cinetica di transizione da quello stato ad un altro invertendo le formule 4.5, ottenendo:

$$\begin{aligned}k_{F \rightarrow U}(f) &= -r \frac{1}{P_F(f)} \frac{dP_F(f)}{df} \\ k_{U \rightarrow F}(f) &= -r \frac{1}{P_U(f)} \frac{dP_U(f)}{df}.\end{aligned}\tag{4.6}$$

Nel caso del nostro hairpin di RNA CD4L20, le costanti cinetiche ottenute sono riportate in figura 4.6, sia per la transizione da stato nativo ad aperto, che per il processo inverso. Si noti come la normalizzazione delle costanti cinetiche al rate di pulling utilizzato permetta di confrontare tra loro i risultati ottenuti con esperimenti di allungamento della molecola realizzati a diverse velocità. I valori di costanti cinetiche ottenute rientrano perfettamente nel range di valori precedentemente misurati in sistemi biologici simili al nostro [5]. Oltre a ciò va sottolineato come i valori ottenuti alle diverse velocità tendano a collassare in un'unica curva, comportamento previsto teoricamente nel caso di sistemi biologici caratterizzati da due principali stati energetici, nei quali cioè non vi siano stati intermedi stabili.

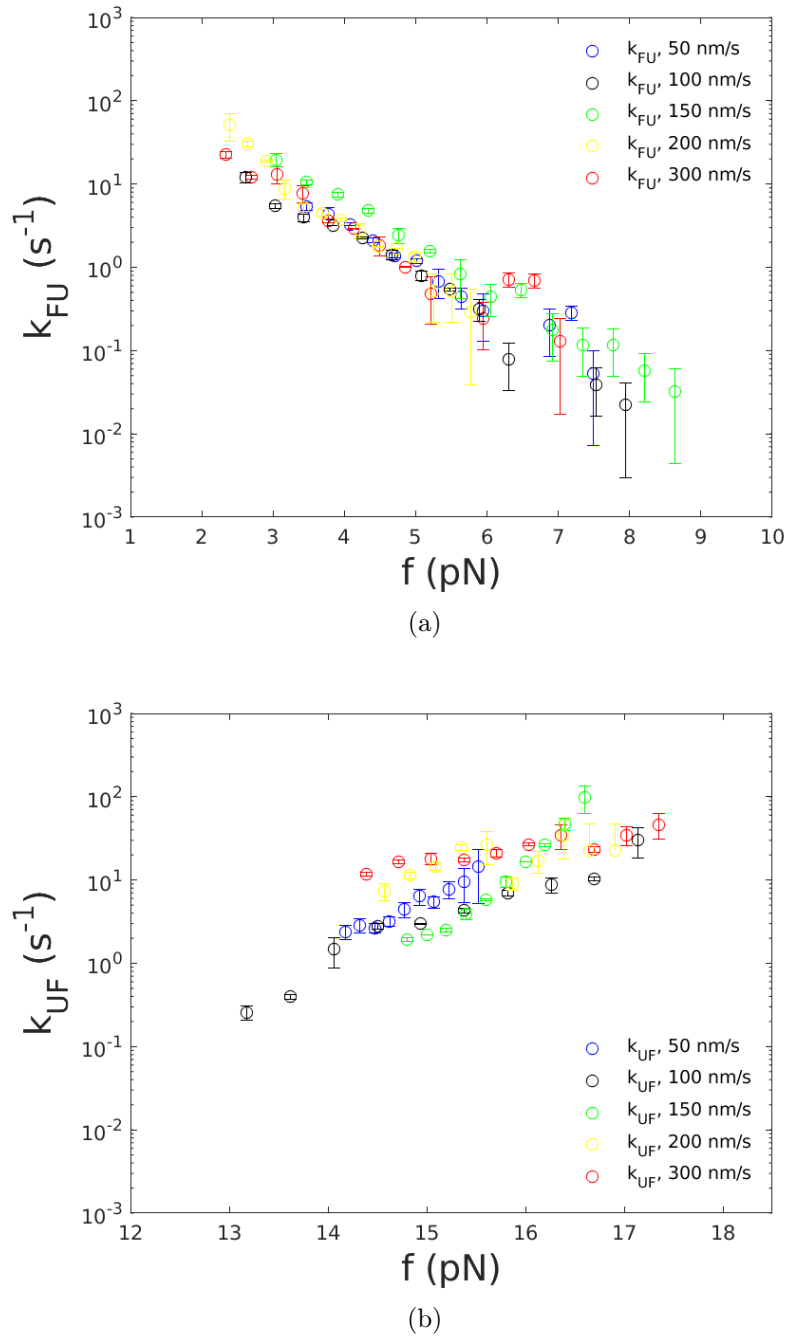


Figura 4.6: **Costanti cinetiche di apertura e chiusura del sistema.** Si riportano le costanti cinetiche del sistema ottenute, in funzione della forza.

### 4.3 Modello di Bell-Evans

Nella sezione precedente si è visto come le costanti energetiche del sistema dipendano dalla forza agente sulla molecola in esame (eq. 4.5, 4.6 e Fig. 4.6) e che sono legate da una relazione matematica all'energia stessa del sistema (eq 4.3). Risulta quindi evidente che nell'interpretazione dei risultati ottenuti con gli esperimenti di pulling il ruolo giocato dalla forza esercitata debba essere incluso nel modello energetico usato. Un primo approccio all'analisi energetica di tali esperimenti è offerto dal modello di Bell-Evans. Tale modello è stato sviluppato prendendo in considerazione un sistema a due stati energetici <sup>1</sup> nel quale la barriera energetica vari con la forza applicata secondo la relazione

$$B_{FU} = B - f\Delta x, \quad (4.7)$$

dove  $B$  è la barriera a forza nulla e  $\Delta x$  l'allungamento del sistema determinato dall'azione della forza  $f$ . Si ha quindi una barriera che si abbassa all'aumentare della forza applicata. Questo modello è stato inizialmente sviluppato per descrivere il free energy landscape relativo al legame tra recettori e ligandi, ma in seguito il suo utilizzo fu esteso anche al caso di fenomeni di allungamento/ripiegamento di hairpin di RNA/DNA o proteine, tanto da essere oggi ampiamente utilizzato nella comunità scientifica per lo studio di tali sistemi biologici. Nel seguito verrà chiarito come tale modello metta in relazione le costanti cinetiche del sistema con la barriera dipendente dalla forza teorizzata da Bell-Evans, consentendo così di ottenere utili informazioni sull'energia libera del sistema studiato.

Come già spiegato in sezione 3.5.1, la variazione di energia libera del sistema tra lo stato aperto e lo stato chiuso può essere scritta al variare del numero di coppie di nucleotidi aperte ( $n$ ) come

$$\Delta G_n(f) = \Delta G_n^0 + \Delta G_n^{st}(f) + \Delta G_n^d(f), \quad (4.8)$$

---

<sup>1</sup>al quale l'hairpin CD4L20 può essere inizialmente approssimato sulla base dei risultati ottenuti nel paragrafo precedente.

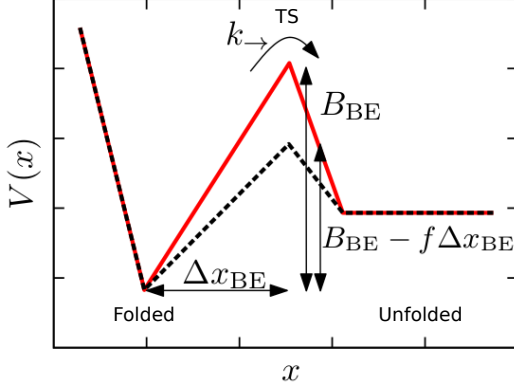


Figura 4.7: **Modello di Bell-Evans [5]**. In figura è riportato il free energy landscape di un sistema a due stati, secondo il modello di Bell-Evans:  $B_{BE}$  è la barriera energetica del sistema, a forza nulla;  $\Delta x_{BE}$  è la distanza tra lo stato nativo (folded) e quello transizionale (TS). Sotto l'azione di una forza  $f$ , il profilo energetico cambia (linea tratteggiata).

dove  $\Delta G_n^0$  è l'energia libera di formazione del sistema a forza nulla,  $\Delta G_n^{st}(f)$  corrisponde al lavoro necessario per tirare la catena nucleotidica (*stretching*) e  $\Delta G_n^d(f)$  è il contributo energetico che deriva dall'orientamento del diametro dell'hairpin nello spazio.

I contributi energetici della formula 4.8 dipendenti dalla forza,  $\Delta G_n^i(f)$  ( $i = d, st$ ), si possono scrivere come

$$\Delta G_n^i(f) = - \int_0^f x_n^i(f') df' = - \left( f x_n^i(f) - \int_0^{x_n^i(f)} F_n^i(x') dx' \right), \quad (4.9)$$

dove  $x_n^i(f)$  è la proiezione del corrispondente contributo all'allungamento del sistema lungo la direzione di azione della forza e  $F_n^i(f)$  è la sua funzione inversa. In riferimento alla figura 4.4, chiamiamo  $\Delta G_{n^\ddagger}(f)$  l'energia libera allo stato transizionale,  $\Delta G_0(f)$  l'energia libera allo stato chiuso e  $\Delta G_N(f)$  l'energia libera dello stato aperto.

Secondo la formula 4.3 possiamo quindi scrivere che

$$k_{F \rightarrow U}(f) = k_0 e^{-\frac{\Delta G_{n^\ddagger}(f) - \Delta G_0(f)}{k_B T}} \quad (4.10)$$

$$k_{U \rightarrow F}(f) = k_0 e^{-\frac{\Delta G_{n^\ddagger}(f) - \Delta G_N(f)}{k_B T}}, \quad (4.11)$$

dove  $k_0$  è la costante cinetica di transizione a forza 0. Combinando le espressioni 4.9, 4.10 e 4.11, le costanti cinetiche  $k_{F \rightarrow U}(f)$  e  $k_{U \rightarrow F}(f)$  si

possono riscrivere come

$$k_{F \rightarrow U} = k_0 \exp \left( -\frac{B(f) - f x_{n^\ddagger}^{st}(f)}{k_B T} \right) \quad (4.12)$$

$$k_{U \rightarrow F} = k_0 \exp \left( -\frac{B(f) - \Delta G(f) - f(x_{n^\ddagger}^{st} + x_{n^\ddagger}^d - x_N^{st})}{k_B T} \right), \quad (4.13)$$

dove

$$B(f) = \Delta G_{n^\ddagger} - \Delta G_0^0 + \int_0^{x_{n^\ddagger}^{st}(f)} F_{n^\ddagger}^{st}(x) dx \quad (4.14)$$

$$\Delta G(f) = \Delta G_N^0 - \Delta G_0^0 + \int_0^{x_N^{st}(f)} F_N^{st}(x) dx - \int_0^{x_{n^\ddagger}^d(f)} F_{n^\ddagger}^d(x) dx. \quad (4.15)$$

A questo punto possiamo definire le distanze end-to-end del sistema nei tre stati, chiuso, di transizione e aperto come:

$$\begin{aligned} x_F(f) &= x_0^d(f) \\ x_{TS}(f) &= x_{n^\ddagger}^{st}(f) + x_{n^\ddagger}^d(f) \\ x_U(f) &= x_N^{st}(f) \end{aligned} \quad (4.16)$$

e dal momento che  $x_0^d(f) = x_{n^\ddagger}^d(f) = x_N^d(f)$  le costanti cinetiche delle formule 4.12 e 4.13 si possono semplificare e risultano quindi pari a

$$\begin{aligned} k_{F \rightarrow U} &= k_0 \exp \left( -\frac{B(f) - f x_{F-TS}(f)}{k_B T} \right) \\ &= k_m \exp \left( \frac{f x_{F-TS}(f)}{k_B T} \right) \end{aligned} \quad (4.17)$$

$$\begin{aligned} k_{U \rightarrow F} &= k_0 \exp \left( -\frac{B(f) - \Delta G(f) + f x_{TS-U}}{k_B T} \right) \\ &= k_m \exp \left( \frac{\Delta G(f) - f x_{TS-U}}{k_B T} \right) \end{aligned} \quad (4.18)$$

dove  $k_m = k_0 \exp(-B(f)/k_B T)$  e  $x_{F-TS} = x_{TS} - x_F$  e  $x_{TS-U} = x_U - x_{TS}$  sono le distanze rispettivamente tra lo stato transizionale e gli stati chiuso e aperto.

La forza alla quale le costanti cinetiche del sistema si eguagliano, ossia la

forza a cui i due stati sono energeticamente equiprobabili, è detta forza di coesistenza ( $f_c$ ). Alla forza di coesistenza quindi le due espressioni 4.17 e 4.18 si eguagliano, da cui risulta che la variazione di energia  $\Delta G$  è legata alla forza di coesistenza dalla seguente formula:

$$\Delta G(f_c) = f_c x_{F-U}(f_c), \quad (4.19)$$

dove  $x_{FU} = x_{F-TS} + x_{TS-U}$  è la distanza tra lo stato aperto e lo stato chiuso alla forza di coesistenza.

Se si considera il logaritmo delle costanti cinetiche riportate date dalle formule 4.17 e 4.18, si ottengono le seguenti espressioni, valide solamente in prossimità della forza di coesistenza:

$$\log k_{F \rightarrow U}(f) = a_U + f \cdot b_U, \quad \log k_{U \rightarrow F}(f) = a_F - f \cdot b_F, \quad (4.20)$$

che possono essere utilizzate per interpolare i dati sperimentali in prossimità della forza di coesistenza. Dai valori delle rette interpolanti è infine possibile ottenere una stima della variazione di energia e della posizione della barriera energetica alla forza di coesistenza, come riportato in seguito:

$$k_m = e^{a_U}, \quad \Delta G = (a_F - a_U)k_B T, \quad x_{F-TS} = b_U k_B T, \quad x_{TS-U} = b_F k_B T. \quad (4.21)$$

I risultati ottenuti dall'analisi di tutti i dati sperimentali sono riportati in tabella 4.1.

| $x_{F-TS}$ (nm) | $x_{TS-U}$ (nm) | $\Delta G_{FU}$ ( $k_B T$ ) | $f_c$ (pN) |
|-----------------|-----------------|-----------------------------|------------|
| $4.1 \pm 0.5$   | $4.8 \pm 0.2$   | $20 \pm 2$                  | $9 \pm 1$  |

Tabella 4.1: **Parametri energetici ottenuti secondo il modello di Bell-Evans.** Parametri energetici ottenuti dal fit di figura 4.8.

I valori ottenuti descrivono uno stato transizionale che alla forza di coesistenza si trova leggermente spostato verso la configurazione chiusa ( $x_{F-TS} < x_{TS-U}$ ) e  $\Delta G$  risulta pari a  $(20 \pm 2) k_B T$ . Il valore teorico di  $\Delta G_{FU}$  calcolato secondo la formula 4.15 risulta pari a  $89.11 k_B T$ : si vede dunque che il valore ottenuto dall'analisi di Bell-Evans è ben lontano da quello teoricamente



atteso. Inoltre, la stima della forza di coesistenza risulta particolarmente sottostimata rispetto al valore ottenuto nel calcolo teorico della FEL nella sezione 3.5.1, che risultava pari a circa 15 pN.

La somma  $x_{F-TS} + x_{TS-U}$  fornisce la distanza tra lo stato di folding e di unfolding, il cui valore atteso alla forza di coesistenza calcolata teoricamente (15 pN) è pari a 26 nm: anche in questo caso non vi è accordo col risultato sperimentale.

Tale forte discrepanza è da ttribuirsi in primis al fatto che le formule usate sono valide solo in prossimità della forza di coesistenza, mentre i dati sperimentali usati per l'interpolazione lineare corrispondono ad un ampio range di forze, e risultano ben lontani dal valore teorico della forza di coesistenza (15 pN). È stata pertanto effettuata una seconda interpolazione lineare considerando i valori delle costanti cinetiche in un intervallo più ristretto, tra 6 e 15 pN (retta verde). Come si può osservare dai dati riportati in tabella 4.2 i parametri aumentano del 20-50% rispetto a quelli ottenuti con l'analisi precedente, avvicinandosi ai valori teorici attesi e confermando il fatto che i risultati ottenuti col modello di Bell-Evans a forze lontane da quelle di coesistenza non possono essere considerati attendibili. Purtroppo, le nostre condizioni sperimentali non consentono di migliorare ulteriormente l'analisi fatta sulla base di tale modello, dal momento che il modello di Bell-Evans può fornire informazioni energetiche precise solamente se si hanno sufficienti dati sperimentali in prossimità della forza di coesistenza. Nel presente caso, a causa della forte isteresi del sistema molecolare dovuta alle notevoli dimensioni del loop, non sono presenti sufficienti punti sperimentali che vadano ad occupare la zona della forza di coesistenza.

| $x_{F-TS}$ (nm) | $x_{TS-U}$ (nm) | $\Delta G_{FU}$ ( $k_B T$ ) | $f_c$ (pN) |
|-----------------|-----------------|-----------------------------|------------|
| $8 \pm 3$       | $4 \pm 2$       | $33 \pm 11$                 | $11 \pm 5$ |

Tabella 4.2: **Parametri energetici ottenuti secondo il modello di Bell-Evans.** Parametri energetici ottenuti dal fit di figura 4.8.

Vi è inoltre una seconda, ma non per questo meno importante, spiegazione per la forte discrepanza osservata tra i valori teorici e quelli ottenuti applicando il modello di Bell-Evans, ossia il fatto che tale modello considera

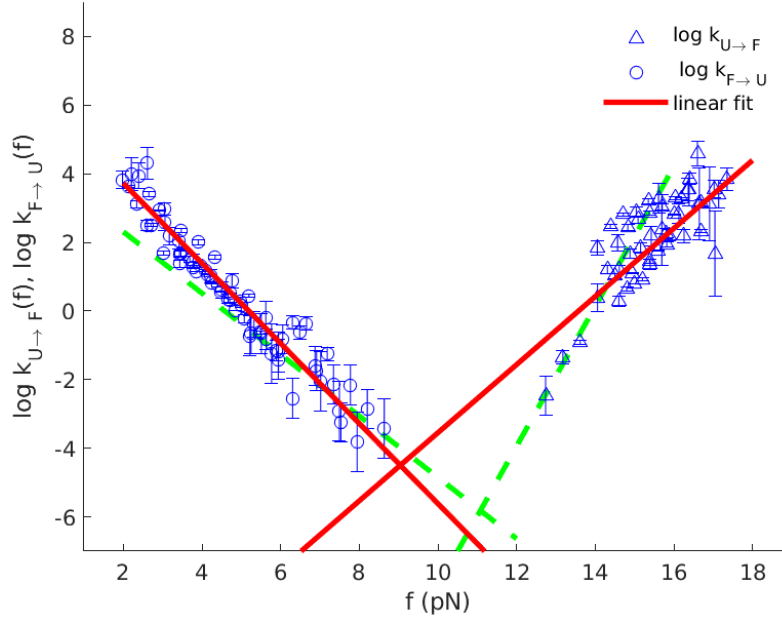


Figura 4.8: **Costanti cinetiche e modello di Bell-Evans.** Si riporta le due interpolazioni lineari effettuate sulle costanti cinetiche sperimentali, al fine di ottenere dai parametri di interpolazione le grandezze  $x_{F-TS}$ ,  $x_{TS-U}$ ,  $\Delta G_{FU}$  e  $f_c$ .

una barriera che non varia la sua posizione al variare della forza applicata. Tale modello non tiene infatti conto del principio di Leffler-Hammond [38, 39], il quale afferma che se due stati, ad esempio uno stato di transizione e un intermedio instabile, si susseguono nel corso di una reazione e sono energeticamente simili, si avrà solo un minimo cambiamento nella struttura molecolare del sistema nell'interconversione tra i due stati, ossia la struttura di uno stato di transizione assomiglia a quello dello stato che gli è più vicino in energia. Secondo il postulato di Leffler-Hammond all'aumentare della forza esercitata alle estremità della molecola la barriera energetica del sistema si sposta sempre più verso lo stato nativo (hairpin chiuso). Il fatto che neppure l'analisi realizzata in prossimità della forza di coesistenza abbia fornito valori compatibili con quelli teorici lascia quindi presupporre che in tali range di forze il postulato di Leffler-Hammond giochi un ruolo rilevante nella determinazione del profilo energetico del sistema, tanto che il movimento della barriera non possa essere trascurato.

Inoltre, in caso di forte asimmetria della barriera, come si verifica nel nostro sistema a causa del loop (Fig. 3.17), la definizione della forza di coesistenza come quel valore di forza a cui gli stati hanno la stessa energia libera può risultare inesatta [35].

Risulta quindi necessario cambiare approccio per estrarre sia i parametri energetici del sistema sia la forza di coesistenza.

## 4.4 Stima della forza di coesistenza

La forza di coesistenza è quella forza a cui il sistema ha uguale probabilità di trovarsi nello stato aperto e nello stato chiuso. Partendo da questa definizione è possibile ottenere la forza di coesistenza dai dati sperimentali, indipendentemente dalla particolare forma che può assumere la barriera energetica tra i due stati configurazionali.

La probabilità che ad una data forza l'hairpin sia aperto è data dall'espressione

$$P(f) = \frac{1}{1 + e^{\frac{(f_c - f)\Delta x}{k_B T}}}, \quad (4.22)$$

dove  $f_c$ , ossia la forza di coesistenza, è il valore di forza in cui la probabilità è pari a 0.5 e  $\Delta x$  è la distanza tra lo stato aperto e lo stato energetico di partenza alla forza di coesistenza.

Partendo dalle probabilità di sopravvivenza (Fig. 4.5) è possibile ottenere  $P$  come  $1 - P_F$ , dove  $P_F$  è la probabilità di sopravvivenza dello stato chiuso lungo le curve di pulling (unfolding).

Le curve di probabilità ottenute per le diverse velocità di pulling sono state interpolate singolarmente con l'equazione 4.22 (Fig 4.9) ed è stata effettuata una media pesata tra i valori di  $f_c$  e  $\Delta x$  ottenuti. Si ricava  $f_c = (15.0 \pm 0.1)$  pN, in perfetto accordo con quanto previsto dal calcolo teorico della FEL in sezione 3.5.1.

Un'attenzione particolare merita la stima di  $\Delta x$  che risulta pari a  $(9.1 \pm 0.1)$  nm e rappresenta la distanza tra lo stato aperto e lo stato energetico precedente. Il valore di  $\Delta x$  suggerisce quindi la possibile esistenza di uno stato intermedio localizzato in prossimità dello stato aperto: tale stato avrebbe

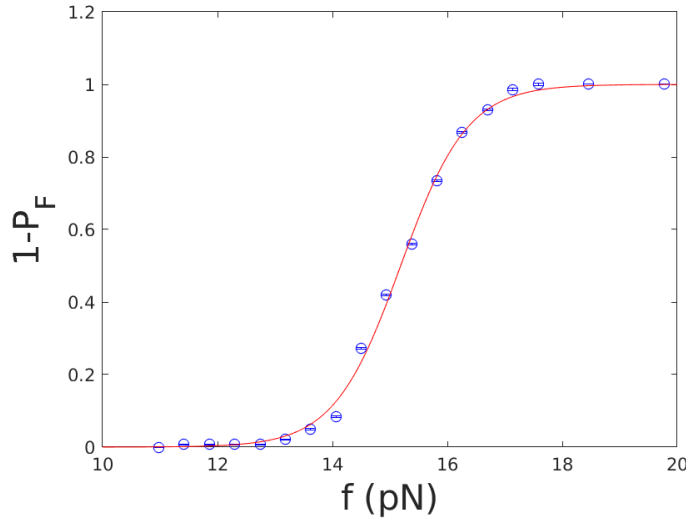


Figura 4.9: **Calcolo della forza di coesistenza.** Si riporta in grafico la probabilità che lo stato si trovi nello stato aperto: la distribuzione è interpolata secondo la formula 4.5, al fine di estrarre una stima della forza di coesistenza.

un'alta energia libera e quindi un tempo di vita medio molto basso che lo rende metastabile e di difficile osservazione con misure di non equilibrio come quelle di pulling. In futuro delle misure di *hopping*, ossia a forza costante, potrebbero fare luce sull'esistenza ed eventuale natura di questo stato intermedio metastabile.

## 4.5 Metodo di Kramers

Per ottenere ulteriori e più attendibili informazioni sulla dipendenza della barriera energetica dalla forza applicata al sistema si può utilizzare un approccio basato sul metodo di Kramers. Lo scopo dell'analisi che sarà presentata in questo paragrafo è quello di comprendere come sia l'altezza che la posizione della barriera dipendano dalla forza e confrontare i risultati teorici con quelli sperimentali relativi all'hairpin di RNA CD4L20.

Il metodo di Kramers prevede di ricavare le costanti cinetiche e l'energia del sistema molecolare a partire dalla densità di probabilità di configurazioni che può assumere la molecola al variare di un parametro  $x$  nel tempo ( $p(x, t)$ ),

coordinata di reazione del sistema rappresentato in figura 4.10. Tale approccio prevede quindi, a differenza del modello di Bell-Evans, che la barriera energetica non sia fissa, ma si muova durante il processo di stiramento della molecola, rispettando quindi il principio di Leffler-Hammond.

La densità di probabilità di configurazioni obbedisce all'equazione di Fokker-Planck:

$$\frac{\partial p(x, t)}{\partial t} = D \frac{\partial}{\partial x} \left[ \frac{\partial}{\partial x} + \frac{1}{k_B T} \frac{dV(x)}{dx} \right] p(x, t), \quad (4.23)$$

dove  $D$  è il coefficiente di diffusione e  $V(x)$  è l'energia libera del sistema monodimensionale [36]. Se al tempo  $t = 0$  la densità di probabilità è pari a  $p(x_0, t = 0) = \delta(x - x_0)$  la soluzione dell'equazione 4.23 è

$$p(x, t) = e^{t\Lambda_{FP}} \delta(x - x_0), \quad (4.24)$$

dove  $\Lambda_{FP} = D \frac{\partial}{\partial x} \left[ \frac{\partial}{\partial x} + \frac{1}{k_B T} \frac{dV(x)}{dx} \right]$  è l'operatore di Fokker Planck.

La probabilità al tempo  $t$  che il sistema rimanga in un opportuno range ( $R$ ) nel dominio della coordinata  $x$  è data da

$$S(x_0, t) = \int_{x \in R} dx p(x, t) = \int_{x \in R} dx e^{t\Lambda_{FP}} \delta(x - x_0), \quad (4.25)$$

che non è altro che la probabilità di sopravvivenza del sistema in quel dato range dei valori di  $x$  ( $R$ ). A partire dalla probabilità di sopravvivenza si può ricavare la densità di probabilità di sopravvivenza nel tempo

$$\rho(t) = -\frac{\partial S(x, t)}{\partial t}, \quad (4.26)$$

dalla quale si ottiene il tempo medio di sopravvivenza del sistema

$$\tau = \int_0^\infty dt t \rho(t) = - \int_0^\infty dt t \frac{\partial S(x, t)}{\partial t} = \int_0^\infty dt S(x, t) = \int_0^\infty dt \int_{x \in R} dx p(x, t). \quad (4.27)$$

Risolvendo l'integrale e facendo agire l'operatore aggiunto  $\Lambda_{FP}^+$  su entrambi i membri dell'equazione, si ottiene la seguente equazione differenziale per il

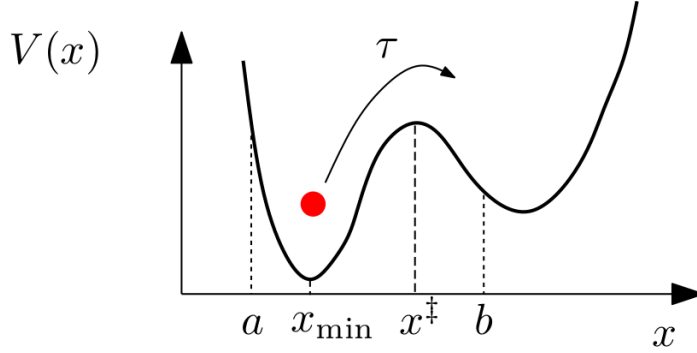


Figura 4.10: **FEL con doppia buca.** [5]. Schema di un generico FEL a due buche: le posizioni  $a$  e  $b$  sono i valori di  $x$  su cui si impongono condizioni al contorno assorbenti (in  $b$ ) e riflesse (in  $a$ ).

tempo

$$\frac{\partial^2 \tau}{\partial x^2} - \frac{1}{k_B T} \frac{dV}{dx} \frac{\partial \tau}{\partial x} = -1. \quad (4.28)$$

Risolvendo tale equazione differenziale nell'intervallo  $a \leq x \leq b$  con condizione al contorno assorbenti in  $b$  ( $\tau(b)=0$ ) e riflesse in  $a$  ( $\partial_x \tau(a)=0$ ), si ottiene [36, 5]

$$\tau(x) = \frac{1}{D} \int_x^b dy e^{\frac{V(y)}{k_B T}} \int_a^y dz e^{-\frac{V(z)}{k_B T}}. \quad (4.29)$$

La costante cinetica  $k_{\rightarrow} = \tau^{-1}$  calcolata sull'intero sistema si ottiene imponendo  $x = a$  e risulta pari a

$$k_{\rightarrow} = \frac{D}{\int_a^b dy e^{\frac{V(y)}{k_B T}} \int_a^y dz e^{-\frac{V(z)}{k_B T}}}. \quad (4.30)$$

Combinando le equazioni 4.3 e 4.30 si ottiene la barriera energetica del sistema, pari a

$$B_{FU} = k_B T \ln \left( \frac{k_0}{D} \int_a^b dy e^{\frac{V(y)}{k_B T}} \int_a^y dz e^{-\frac{V(z)}{k_B T}} \right). \quad (4.31)$$

Nel caso dell'hairpin,  $V(x)$  può essere identificato con l'energia libera  $\Delta G_n$ . Essendo la coordinata di reazione del nostro sistema discreta ( $n$ , numero di nucleotidi aperti), il doppio integrale dell'equazione 4.31 diventa

una doppia sommatoria fornendo un'espressione discretizzata della barriera energetica del sistema:

$$B_{FU}(f) = k_B T \ln \left( \sum_{n=0}^N \sum_{n'=0}^n e^{\frac{\Delta G_n(f) - \Delta G_{n'}(f)}{k_B T}} \right). \quad (4.32)$$

La dipendenza teorica della barriera dalla forza applicata al sistema può quindi essere valutata usando la formula 4.32 e i diversi contributi all'energia libera riportati nel capitolo precedente (formule 3.32, 3.33, 3.36, 3.37, 3.38). Tale grandezza può essere ottenuta anche a partire dalle costanti cinetiche sperimentali riportate nel paragrafo 4.2.1 (Fig. 4.6). Infatti:

$$k_{F \rightarrow U}(f) = k_0 e^{-\frac{B_{FU}(f)}{k_B T}} \quad (4.33)$$

$$k_{U \rightarrow F}(f) = k_0 e^{-\frac{B_{FU}(f) - \Delta G_{FU}}{k_B T}}, \quad (4.34)$$

dove  $\Delta G_{FU}(f) = G_U(f) - G_F(f) = \Delta G_{n=N}(f) - \Delta G_{n=0}(f)$  è la differenza di energia libera tra lo stato aperto e lo stato chiuso alla forza 0, e  $k_0$  è la costante cinetica relativa al passaggio tra i due stati configurazionali a forza 0. Applicando i logaritmi alle espressioni 4.33 e 4.34, si ottiene

$$\frac{B_{FU}(f)}{k_B T} = \ln k_0 - \ln k_{F \rightarrow U}(f) \quad (4.35)$$

$$\begin{aligned} \frac{B_{FU}(f)}{k_B T} &= \ln k_0 - \ln k_{U \rightarrow F}(f) + \frac{\Delta G_{FU}(f)}{k_B T} \\ &= \ln k_0 - \ln k_{U \rightarrow F}(f) + \frac{\Delta G_{FU}^0 - \int_0^f x_N(f') df' + \int_0^f x_d(f') df'}{k_B T}, \end{aligned} \quad (4.36)$$

i cui termini dell'ultimo addendo si ottengono in base alle formule 3.36 e 3.38.

A partire da queste ultime equazioni è possibile quindi ricavare i valori di  $B_{FU}$  e confrontarli con i valori teorici forniti dalla formula 4.32.

A tale scopo, a partire dalle costanti cinetiche sperimentali  $k_{F \rightarrow U}$  e  $k_{U \rightarrow F}$

sono state calcolate le quantità a sinistra del simbolo di uguaglianza

$$-\ln k_{F \rightarrow U}(f) = \frac{B_{FU}(f)}{k_B T} - \ln k_0 \quad (4.37)$$

$$-\ln k_{U \rightarrow F} + \frac{-\int_0^f x_N(f') df' + \int_0^f x_d(f') df'}{k_B T} = \frac{B_{FU}(f)}{k_B T} - \ln k_0 - \frac{\Delta G_0}{k_B T}. \quad (4.38)$$

Sono stati quindi trovati i parametri  $-\ln k_0$  e  $\Delta G_0/k_B T$  che ottimizzavano l'accordo tra i valori di  $B_{FU}$  teorici (eq. 4.32 e sperimentali 4.37 e 4.38). In particolare, con un opportuno programma di analisi dati è stata minimizzata la distanza dai dati teorici ricavando dapprima, tramite i valori  $-\ln k_{F \rightarrow U}(f)$  una stima di  $k_0$ , per poi ottenere tramite i dati ottenuti dalle  $k_{U \rightarrow F}$  una stima di  $\Delta G_0$ . Dal momento che le costanti cinetiche sono state ottenute dai due rami delle curve di pulling separati dal salto di forza ( $\delta f$ ), le espressioni 4.37 e 4.38 sono state valutate a  $f - \frac{\delta f}{2}$  e a  $f + \frac{\delta f}{2}$  rispettivamente al fine di poterle confrontare con la curva teorica [37].

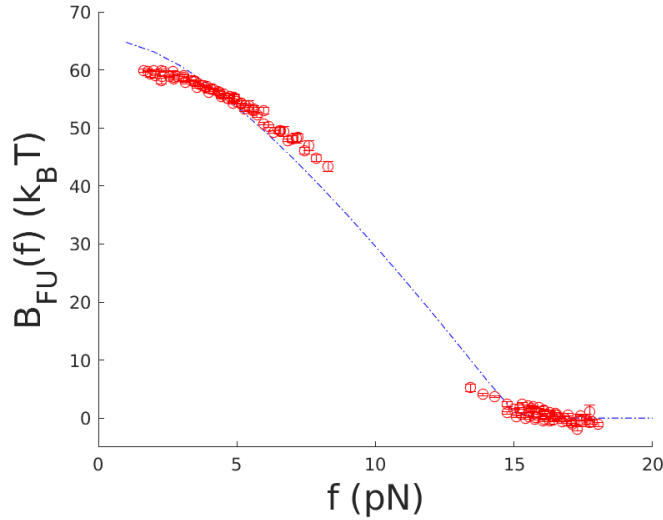


Figura 4.11: **Barriera energetica  $B_{FU}$  tramite il modello di Kramers.** Si riporta la curva teorica ottenuta assieme ai dati ottenuti a partire dalle costanti cinetiche sperimentali, secondo il modello di Kramers.

In figura 4.11 è riportata la curva teorica della barriera energetica, calcolata tramite il metodo di Kramers (4.32), e i dati sperimentali opportunamente



traslati. Le costanti di traslazione ottenute dall'analisi permettono di stimare la differenza energetica tra lo stato chiuso e aperto dell'hairpin a forza zero pari a  $\Delta G_0 = (62.8 \pm 0.3) k_B T$  e la costante cinetica a forza zero pari a  $k_0 = (15 \pm 7) s^{-1}$ . Gli errori di tali stime derivano dalla semidispersione massima calcolata facendo variare il valore della lunghezza di persistenza  $P$  entro il suo errore sperimentale (sezione 3.4.2). Nel caso di  $\Delta G_0$  la variazione del valore di  $P$  non incide particolarmente sul valore finale, che rimane in ottimo accordo con quanto previsto dal server Mfold per un hairpin di RNA CD4L20, pari a  $65.4 k_B T$ . Bisogna infatti tener conto che nella modellizzazione iniziale del sistema sono state effettuate varie semplificazioni, come l'aver trattato l'hairpin come un polimero non interagente o aver assunto che la forza di stretching non influisse sull'energia libera di legame delle basi. Considerando la presenza di tali semplificazioni, l'accordo tra il valore teorico e quello sperimentale viene generalmente considerato molto buono in letteratura.

Non è così invece nel caso di  $k_0$ : infatti il valore di persistenza della catena, indice della sua facilità a deformarsi, incide notevolmente sulla capacità del sistema di cambiare stato energetico, influenzando sensibilmente il valore finale di  $k_0$ .

Il valore di  $k_0$  ottenuto è, come atteso, minore rispetto a quello riportato in letteratura per l'hairpin CD4 RNA con tetraloop, pari a  $10^5 s^{-1}$  [23, 37]. Tale discrepanza è dovuta all'aumento notevole della barriera energetica nell'hairpin CD4L20: maggiore è la barriera cinetica, più improbabile sarà il passaggio dallo stato chiuso allo stato aperto a forza zero.

Woodside et al. [35] riportano in letteratura una variazione simile a quella riscontrata in questo lavoro di tesi per hairpin con variazioni significative nella lunghezza del loop. Un altro importante parametro per l'analisi energetica del sistema in esame riguarda la posizione della barriera e la sua variazione con la forza applicata.

Dalla curva della barriera energetica di figura 4.11 si possono ricavare informazioni riguardo la posizione della barriera stessa rispetto agli stati chiuso

$(x_{F-TS})$  e aperto  $(x_{TS-U})$  al variare della forza, secondo le espressioni [37]

$$x_{F-TS}(f) = -\frac{\partial B_{FU}}{\partial f}, \quad x_{TS-U}(f) = \frac{\partial(B_{FU}(f) - \Delta G_{FU}(f))}{\partial f}. \quad (4.39)$$

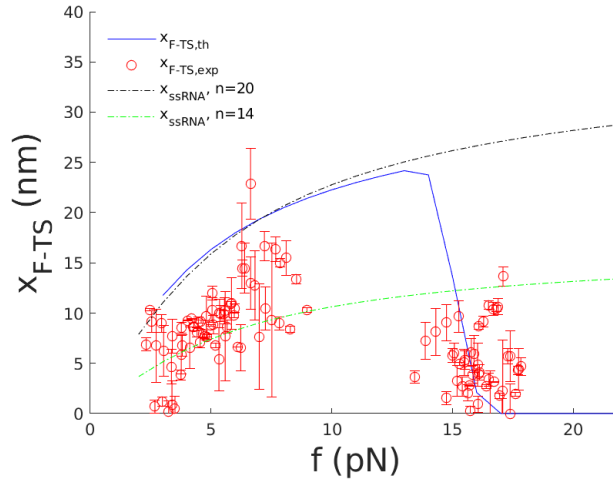
La posizione della barriera lungo la coordinata di reazione  $x$  è inoltre legata alla fragilità della molecola, che determina quanto la costante cinetica di folding o unfolding sia sensibile alla forza. La fragilità  $\mu$  è definita come

$$\mu(f) = \frac{x_{F-TS}(f) - x_{TS-U}(f)}{x_{F-TS}(f) + x_{TS-U}(f)} : \quad (4.40)$$

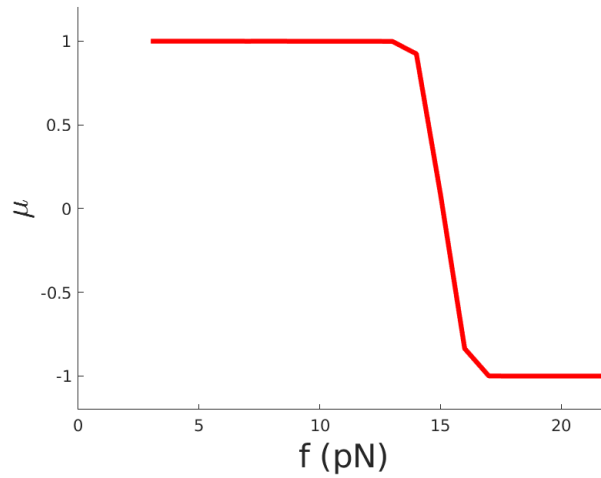
se  $\mu < 0$  significa che la barriera è spostata verso lo stato chiuso e la molecola è più fragile. Nel caso opposto,  $\mu > 0$ , la molecola è maggiormente flessibile, può essere più facilmente deformata prima di transire da uno stato all'altro, e la barriera è spostata verso lo stato aperto [37].

In figura 4.12(a) si riportano le curve ottenute relative alla distanza della barriera dallo stato nativo  $(x_{F-TS}(f))$  e dallo stato aperto  $(x_{TS-U}(f))$ . In figura 4.12(b) è invece rappresentata la curva di fragilità ottenuta alle forze corrispondenti. I dati sperimentali di  $x_{F-TS}$  si accordano bene all'andamento teorico della posizione della barriera, specialmente a forze alte. A forze basse, invece, la minore statistica e il rumore sperimentale, tipico delle misure realizzate a bassi valori di forza, non forniscono dati altrettanto soddisfacenti, oltre al fatto che le approssimazioni citate sopra hanno un peso più rilevante quando tutti i legami tra le basi sono esistenti, ossia l'hairpin si trova nello stato chiuso. Confrontando i valori di  $x_{F-TS}(f)$  con l'allungamento massimo  $x_{ssRNA}$  dell'hairpin previsto dal modello Worm Like Chain (ossia nel caso in cui sia nello stato aperto) si nota come a basse forze i valori di  $x_{F-TS}$  e  $x_{ssRNA}$  siano molto prossimi, indicando quindi che in tale range di forze lo stato transizionale si trova molto prossimo allo stato aperto. Inoltre, la fragilità calcolata a 5 pN è pari a +0.99, ovvero la molecola è più flessibile e tende ad allungarsi sensibilmente prima di transire nello stato aperto. Nel momento in cui invece la forza supera i 14 pN, la barriera si avvicina velocemente allo stato nativo, facilitando quindi la transizione del sistema verso la configurazione aperta: la fragilità a  $f=16$  pN è infatti pari a -0.84.

È inoltre importante sottolineare come in prossimità della forza di coesistenza (15 pN) la posizione della barriera vari molto rapidamente, confermando il fatto che in prossimità di tale forza il postulato di Leffler-Hammond non può essere trascurato, come invece succedeva applicando il metodo di Bell-Evans. Si è quindi provveduto a cercare il valore corrispondente alla posizione dello stato transizionale alla forza di coesistenza che risultano rispettivamente pari a  $x_{TS-U} = (12 \pm 3)$  nm e  $x_{F-TS} = (12 \pm 3)$  nm. Gli errori di tali stime sono stati stimati considerando la semidispersione massima a partire dall'incertezza di  $f_c$ . Si può inoltre cercare una corrispondenza tra la distanza  $x_{F-TS}$  e la coordinata di reazione  $n$  (paia di basi dello stem), a collegamento dell'analisi di free energy landscape fatta con il metodo di Kramers e quella teorica vista nella sezione 3.5.1. Tramite il modello WLC (curva verde) risulta che alla forza di coesistenza il valore di  $x_{F-TS}(f_c)$  si traduce in una posizione della barriera energetica corrispondente ad  $n = 14 \pm 1$  in figura 3.17(b). Questo risultato è in accordo con il fatto che a  $f_c$  la barriera sia più vicina allo stato aperto ( $x_{TS-U}(f_c) < x_{F-TS}(f_c)$ ) e conferma come il metodo di Kramers sia un valido strumento per determinare a priori le diverse configurazioni di un sistema molecolare e la loro evoluzione sotto l'azione di una forza esterna.



(a)



(b)

Figura 4.12: **Posizione della barriera energetica e fragilità del sistema.** In a) si riporta nel grafico l'andamento teorico della posizione della barriera energetica rispetto allo stato nativo, al variare della forza con sovrapposti i punti sperimentali. La curva tratteggiata è l'allungamento dell'hairpin calcolato secondo il modello WLC. In b) è riportato l'andamento corrispondente della fragilità del sistema.



# Conclusioni

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è stato lo studio del comportamento di un hairpin di CD4L20 RNA sotto l'azione di una forza applicata alle sue estremità tramite l'uso della tecnica sperimentale delle pinzette ottiche.

L'hairpin CD4L20 RNA è una mutazione dell'hairpin CD4 mRNA dal quale differisce per un loop formato da 20 nucleotidi. L'hairpin CD4 mRNA negli organismi umani porta alla trascrizione della glicoproteina CD4 che si trova sulla membrana dei Linfociti T: questa proteina costituisce il punto di attacco del virus dell'immunodeficienza umana (HIV) ai linfociti [21]. Uno studio approfondito dell'hairpin CD4L20 può quindi aiutare a comprendere come variazioni nella struttura primaria e secondaria del sistema originario introducano variazioni nel *Free Energy Landscape* del sistema e quindi, in ultima istanza, nella funzione biologica dello stesso, portando sperabilmente ad un rallentamento o inibizione dell'attacco condotto dal virus HIV.

Il set-up sperimentale utilizzato nel presente lavoro di tesi consiste in un sistema di mini-Optical Tweezers che genera una trappola ottica attraverso due fasci laser nell'infrarosso ( $\lambda = 805$  nm) contropropaganti, focalizzati tramite obiettivi ad immersione ad alta apertura numerica. Gli esperimenti sono stati condotti all'interno di una camera microfluidica posta tra i due obiettivi.

La parte iniziale del lavoro di tesi è stata finalizzata ad un'ottimizzazione dell'apparato sperimentale, che era da poche settimane arrivato in dipartimento. Particolare cura è stata dedicata a trovare le migliori condizioni sperimentali per la realizzazione delle camerette microfluidiche e della micropipetta, dal momento che questi costituenti giocano un ruolo chiave nelle misure sperimentali e, se non ottimizzati, possono introdurre perturbazioni

che ne inficiano l'attendibilità.

La geometria sperimentale utilizzata prevede che le estremità della molecola in esame siano attaccate a due biglie tramite selettivi legami biochimici (Digoxigenina-Antidigoxigena e Streptavidina-Biotina) creati grazie a un'opportuna funzionalizzazione delle biglie e della molecola stessa; una delle due biglie è tenuta in posizione fissa sulla punta di una micropipetta, mentre l'altra è intrappolata otticamente. Muovendo la trappola ottica sono state effettuate misure di pulling sull'hairpin: allontanando le biglie tra loro si applica alle estremità dell'hairpin una forza crescente, da 0 pN a circa 25 pN, la quale torna a 0 pN riavvicinando le biglie. Tali misure di pulling sono state effettuate a diverse velocità (50 nm/s, 100 nm/s, 150 nm/s, 200 nm/s e 300 nm/s) al fine di osservare se tale parametro influenzi significativamente la risposta del sistema molecolare.

Innanzitutto sono state studiate le curve di pulling sperimentali analizzando i salti di forza e il valore di forza al quale avviene il cambiamento di configurazione dell'hairpin, dallo stato chiuso allo stato aperto. Questa analisi ha permesso di calcolare i valori di allungamento dell'hairpin al variare della forza applicata e il loro andamento è stato confrontato con il modello *Worm Like Chain*. Da tale confronto emerge che anche nel caso dell'hairpin CD4L20 è possibile approssimare il sistema come una catena polimerica semiflessibile e ottenere quindi i principali parametri elastici della molecola, come la lunghezza di contorno e quella di persistenza. In particolare, la lunghezza di persistenza risulta pari a  $P = 0.69 \pm 0.05$  nm, valore in accordo con quanto riportato in letteratura [23]. Inoltre, conoscendo la distanza tra i nucleotidi in una catena di RNA,  $d_b = 0.665$  nm, tramite il modello WLC è stato ricavato il numero di nucleotidi che si sono aperti ad ogni salto di forza: la distribuzione dei nucleotidi aperti nella transizione da stato chiuso ad aperto (e viceversa) fornisce un valore medio pari al numero totale di nucleotidi che compongono l'hairpin (60). Tale risultato indica che l'hairpin sotto l'azione della forza ha un comportamento approssimabile con un sistema a due stati, passando dalla configurazione chiusa a quella completamente aperta in maniera cooperativa. Questa prima analisi ha inoltre evidenziato come il sistema sia caratterizzato da una grande isteresi, con una differenza tra la

forza media di apertura e di chiusura del sistema di circa 10 pN.

Confermato il comportamento a due stati dell'hairpin CD4L20, si è proceduto alla modellizzazione del *Free Energy Landscape* teorico del sistema, considerando vari contributi energetici presenti e usando il numero di paia di basi dello stem come coordinata di reazione. Tale analisi ha messo in evidenza la presenza di una barriera energetica asimmetrica tra lo stato chiuso e quello aperto e ha permesso di ottenere una prima stima della forza di coesistenza del sistema (15 pN), intesa come la forza alla quale i due stati del sistema hanno la stessa energia libera.

La seconda parte della tesi (cap 4) è stata dedicata all'analisi dei principali parametri cinetici ed energetici derivabili dalle misure di pulling realizzate. A partire dalle distribuzioni delle forze di apertura e chiusura dell'hairpin (Fig. 4.1), sono state calcolate le probabilità di sopravvivenza dello stato chiuso e dello stato aperto (Fig. 4.5) al variare della forza applicata all'hairpin, da cui è stato possibile ottenere le costanti cinetiche sperimentali ( $k_{F \rightarrow U}$  e  $k_{U \rightarrow F}$ ) del sistema (Fig. 4.6).

Le costanti cinetiche sono parametri molto interessanti nello studio delle configurazioni energetiche di un sistema, dal momento che da esse è possibile derivare utili informazioni riguardo la barriera energetica del sistema e il suo cambiamento al variare della forza. Ciò aiuta pertanto a comprendere meglio come al variare delle condizioni sperimentali in cui si trova il sistema sia energeticamente favorito uno stato piuttosto che un altro.

È stato inizialmente applicato il modello di Bell-Evans, il quale assume che la barriera si trovi in una posizione fissa e vari solamente la sua energia all'aumentare della forza applicata sul sistema (Fig. 4.7); inoltre, tale modello permette di trovare l'ampiezza della barriera e la sua posizione in un range di forze prossime a quella di coesistenza, definita come quella forza a cui le costanti cinetiche dei processi di apertura e chiusura del sistema si eguagliano. Quest'ultima proprietà del modello risulta particolarmente limitante nel caso del sistema biologico studiato in questo lavoro di tesi, dal momento che esso è caratterizzato da una grande isteresi e pertanto le costanti cinetiche per il processo di chiusura dell'hairpin risiedono in un range di forze molto lontano dalla forza di coesistenza. L'assenza di valori cinetici in prossimità



della forza di coesistenza porta generalmente ad una sottostima dei due parametri ricercati, come riscontrato anche in questo lavoro. Oltre a ciò, va sottolineato il fatto che l'assunzione che la barriera non cambi posizione al variare della forza è in disaccordo con teorema di Leffler-Hammond, il quale prevede che la barriera all'aumentare della forza applicata al sistema, si sposti verso lo stato aperto. Se per molti sistemi biologici tale assunzione non altera significativamente i risultati finali dell'analisi dal momento che la loro barriera energetica varia lentamente posizione in prossimità della forza di coesistenza, questo non è il caso della molecola CD4L20, la cui barriera si sposta velocemente dallo stato aperto a quello nativo attorno a 15 pN.

La stima della forza di coesistenza è quindi ricavata come quel valore al quale la probabilità del sistema di trovarsi allo stato aperto durante il processo di pulling è pari a  $1/2$  (eq. 4.22, Fig. 4.9). La stima sperimentale della forza di coesistenza ottenuta è pari a  $f_c = (15.0 \pm 0.1)$  pN, in ottimo accordo con quella derivata teoricamente nel capitolo 3.

Preso atto delle limitazioni che impediscono di applicare in maniera soddisfacente il modello di Bell-Evans al nostro sistema biologico, si è proseguita l'analisi energetica utilizzando il metodo di Kramers. Tale metodo riprende da Bell-Evans l'idea di una barriera la cui ampiezza cali all'aumentare della forza applicata, ma considera anche il fatto che la sua posizione possa variare sensibilmente con la forza. È stata quindi calcolata la distribuzione teorica (eq. 4.32) dell'ampiezza della barriera al variare della forza applicata al sistema e dal confronto con i dati sperimentali si sono potute stimare le differenze di energia libera a forza zero tra lo stato nativo e quello aperto, pari a  $\Delta G_0 = (62.8 \pm 0.3) k_B T$ , e la costante cinetica a forza nulla del sistema, pari a  $k_0 = (15 \pm 7) s^{-1}$ . Il valore di  $\Delta G_0$  è in buon accordo con quanto previsto teoricamente dal server Mfold [32], mentre il valore di  $k_0$  presenta una discrepanza ragionevole rispetto a quanto ottenuto nel caso di hairpin di CD4 con tetraloop [23, 37, 35]. Tale differenza è principalmente dovuta alla presenza nella struttura dell'hairpin di un loop significativamente più grande, che contribuisce a diminuire le costanti cinetiche di transizione tra lo stato chiuso ed aperto a parità di struttura dello stem.

Tramite il metodo di Kramers si è inoltre ottenuta la distribuzione della po-

sizione della barriera rispetto allo stato nativo  $x_{F-TS}(f)$  e rispetto allo stato aperto  $x_{TS-U}(f)$  al variare della forza e si è calcolata la fragilità del sistema alle varie forze. L'analisi energetica del sistema mostra quindi che la barriera energetica, inizialmente vicino allo stato aperto, all'aumentare della forza applicata al sistema diminuisce il suo valore e si sposta verso lo stato nativo, secondo quanto previsto dal teorema di Leffler-Hammond; a forze basse la barriera si trova vicino allo stato aperto e il sistema è più flessibile ( $\mu > 0$ ), mentre a forze alte la barriera si sposta verso lo stato chiuso, e il sistema è più fragile ( $\mu < 0$ ).

I teoremi e gli approcci usati in questo lavoro di tesi per l'analisi termodinamica del nostro sistema partono dal presupposto che quest'ultimo si trovi in una situazione di equilibrio termodinamico sia nello stato iniziale che finale. Questo rappresenta però una limitazione nel momento in cui siano presenti stati intermedi metastabili che difficilmente sono osservabili in situazioni di equilibrio e che emergono nel momento in cui il sistema viene sottoposto a processi di non equilibrio, com'è il caso delle misure di pulling realizzate con le pinzette ottiche. Questi stati energetici metastabili giocano spesso un ruolo chiave in molti processi biochimici, come nel caso dell'apertura e ripiegamento di catena polimeriche, influenzando la risposta complessiva del sistema nel momento in cui esso viene sottoposto a trasformazioni termodinamiche di non equilibrio. La presenza di questi stati metastabili può inoltre modificare in modo diverso i processi di transizione da uno stato ad un altro a seconda della direzione della reazione, risultando ad esempio più evidenti nella fase di allungamento dell'hairpin che in quella di ripiegamento. In effetti, i risultati preliminari ottenuti in questo lavoro di tesi sembrano suggerire la possibile presenza di stati metastabili con tempi di vita estremamente veloci, come emerso dall'analisi della curva di probabilità dello stato aperto e dal fatto che le costanti cinetiche sperimentali  $k_{F \rightarrow U}$  al variare della velocità risultino meno sovrapponibili rispetto a quelle relative al processo inverso.

Un valido strumento per confermare o meno la presenza di tali stati (stati di mal ripiegamento, stati intermedi, etc) è rappresentato dai teoremi di fluttuazione e loro estensione al caso di processi termodinamici di parzia-

le equilibrio, nonché da misure di hopping a forza costante realizzate con le pinzette ottiche. Tale approfondimento rappresenta pertanto il naturale prosieguo del presente lavoro di tesi.

# Bibliografia

- [1] F. Ritort, *Single-molecule experiments in biological physics: methods and applications*, J. Phys.: Condens. Matter 18 (2006) R531–R583
- [2] Keir C. Neuman and Attila Nagy, *Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy*, Nat Methods. 2008 June ; 5(6): 491–505. doi:10.1038/nmeth.1218
- [3] A. Ashkin, *Acceleration and trapping of particles by radiation pressure*, Physical Review Letters, Vol. 24, No. 4, pp. 156–159, 1970.
- [4] A. Ashkin, J. Dziedzic, J. Bjorkholm, and S. Chu, *Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles*, Optics letters, Vol. 11, No. 5, pp. 288–290, 1986.
- [5] Anna Alemany i Arias, *Dynamic force spectroscopy and folding kinetics in molecular systems*, Universitat de Barcelona, setembre 2014.
- [6] Josep Maria Huguet i Casades, *Statistical and thermodynamic properties of DNA unzipping experiments with optical tweezers*, PhD thesis, Universitat de Barcelona, 2006
- [7] G Gouesbet et al., *Scattering of a Gaussian beam by a Mie scatter center using a Bromwich formalism*, J. Optics (Paris), 1985, vol. 16, no 2, pp. 83-93
- [8] K. F. Ren, G. Greha, and G. Gouesbet, *Radiation pressure forces exerted on a particle arbitrarily located in a gaussian beam by using the generalized*

- lorenz-mie theory, and associated resonance effects*, Opt. Commun. 108, 343–354 (1994)
- [9] E. Almaas and I. Brevik, *Radiation forces on a micrometer-sized sphere in an evanescent field*, Vol. 12, No. 12 / December 1995 / J. Opt. Soc. Am. B
- [10] M. Kerker, *The scattering of light and other electromagnetic radiation*, Academic Press, New York, 1969
- [11] Neuman K.C. and Block S.M. *Optical trapping*, Rev. Sci. Instrum., 75(9):2787–2809, 2004
- [12] J. R. Moffitt, Y. R. Chemla, S. B. Smith, and C. Bustamante. *Recent advances in optical tweezers. Annual Review of Biochemistry*, Vol. 77, pp. 205–228, 2008.
- [13] R. M. Simmons, J. T. Finer, S. Chu, and J. A. Spudich. *Quantitative measurements of force and displacement using an optical trap*, Biophysical Journal, Vol. 70, No. 4, pp. 1813–1822, 1996.
- [14] K. Visscher, S. P. Gross, and S. M. Block. *Construction of multiple-beam optical traps with nanometer-resolution position sensing*, Selected Topics in Quantum Electronics, IEEE Journal of, Vol. 2, No. 4, pp. 1066–1076, 1996.
- [15] Carlos Bustamante, Jed C. Macosko and Gijs J. L. Wuite, *Grabbing the cat by the tail: manipulating molecules one by one*, , 2000. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1:130–36
- [16] Carlos Bustamante, Zev Bryant, and Steven B. Smith, *Ten years of tension: single-molecule DNA mechanics*, 2003. Nature 421:423–27
- [17] Peter C. Anthony, Adelene Y. L. Sim, Vincent B. Chu, Sebastian Doniach, Steven M. Block, and Daniel Herschlag, *Electrostatics of Nucleic Acid Folding under Conformational Constraint*, J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 4607–4614

- [18] S. B. Smith and C. Rivetti. <http://tweezerslab.unipr.it>. web, 2013.
- [19] S. B. Smith and C. Bustamante, *Optical beam translation device and method using a pivoting optical fiber*, US Patent, Vol. 7, pp. 274,451 B2, 2006.
- [20] Steven B. Smith, Yujia Cui, and Carlos Bustamante, *[7]Optical-trap force transducer that operates by direct measurement of light momentum*, Methods in enzymology, Vol. 361, pp. 134–162, 2003.
- [21] Craig B. Wilen, John C. Tilton e Robert W. Doms, *HIV: cell binding and entry*, Cold Spring Harb Perspect Med 2012;2:a006866
- [22] William Stephenson, Sean Keller, Rachel Santiago, James E. Albrecht, Papa Nii Asare-Okai, Scott A. Tenenbaum, ad Michael Zuker de and Pan T. X. Li, *Combining temperature and force to study folding of an RNA hairpin*, Phys. Chem. Chem. Phys., 2014, 16, 906
- [23] C. V. Bizarro, A. Alemany and F. Ritort, *Non-specific binding of Na<sup>+</sup> and Mg<sup>2+</sup> to RNA determined by force spectroscopy methods*, 6922–6935 Nucleic Acids Research, 2012, Vol. 40, No. 14
- [24] D.Collin, F. Ritort, C. Jarzynski, S.B. Smith, I. Tinoco Jr e C. Bustamante, *Verification of the Crooks fluctuation theorem and recovery of RNA folding free energies*, Nature Publishing Group, Vol 437, 2005
- [25] C. Bustamante, J. Marko, E. D. Siggia, and S. B. Smith, *Entropic elasticity of  $\lambda$ -phage DNA*, Science, Vol. 265, No. 5178, pp. 1599–1600, 1994
- [26] C. Bouchiat, M. D. Wang, J. F. Allemand, T. Strick, S. M. Block, and V. Croquette, *Estimating the persistence length of a worm-like chain molecule from force-extension measurements*, Biophysical journal, Vol. 76, No. 1, pp. 409–413, 1999
- [27] Michael Rubinstein e Ralph H. Colby, *Polymer Physics*, Oxford University Press, 2003

- 
- [28] Philip Nelson, *Biological Physics: Energy, Information, Life*, [www.physics.upenn.edu/~pcn/](http://www.physics.upenn.edu/~pcn/), 2002
- [29] Jong-Chin Lin, Changbong Hyeon, and D. Thirumalai, *RNA under tension: Folding Landscapes, Kinetic partitioning Mechanism, and Molecular Tensegrity*, J Phys Chem Lett. ; 3(23): 3616–3625 (2013)
- [30] Ignacio Tinoco Jr., Carlos Bustamante, *The effect of force on thermodynamics and kinetics of single molecule reactions*, Biophysical Chemistry 101 – 102 (2002) 513–533
- [31] Tianbing Xia, John SantaLucia, Jr., Mark E. Burkard, Ryszard Kierzek, Susan J. Schroeder, Xiaoqi Jiao, Christopher Cox, and Douglas H. Turner, *Thermodynamic Parameters for an Expanded Nearest-Neighbor Model for Formation of RNA Duplexes with Watson-Crick Base Pairs*, Biochemistry 1998, 37, 14719-14735
- [32] M. Zuker., *Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction*, Nucleic acids research, Vol. 31, No. 13, pp. 3406–3415, 2003
- [33] Meyer B. Jackson, *Molecular and cellular biophysics*, Cambridge University Press 2006
- [34] Eli Barkai, Frank L H Brown, Michel Orrit, Haw Yang, *Theory and Evaluation of Single-Molecule Signals*, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. (2008)
- [35] Michael T. Woodside, William M. Behnke-Parks, Kevan Larizadeh, Kevin Travers, Daniel Herschlag, and Steven M. Block, *Nanomechanical measurements of the sequence-dependent folding landscapes of single nucleic acid hairpins*, PNAS, April 18, 2006, vol. 103 no. 16, 6195
- [36] Changbong Hyeon and D Thirumalai, *Measuring the energy landscape roughness and the transition state location of biomolecules using single molecule mechanical unfolding experiments*, J. Phys.: Condens. Matter 19 113101 (2007)

- 
- [37] M. Manosas, D. Collin, F. Ritort, *Force dependent fragility in RNA hairpin*, Phys Rev Lett. 2006 Jun 2;96(21):218301.
- [38] G. S. Hammond, *A correlation of reaction rates*, Journal of the American Chemical Society, Vol. 77, No. 2, pp. 334–338, 1955
- [39] J. E. Leffler, *Parameters for the Description of Transition States*, Science (New York, NY), Vol. 117, No. 3039, p. 340, 1953.